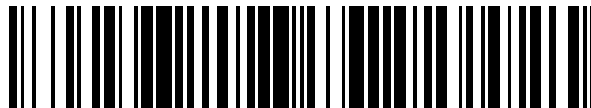


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 365**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/US2012/060998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059576**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12841007 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2768981**

54 Título: **Método para determinar la cigosidad del gen fad2 en canola usando PCR de punto final**

30 Prioridad:

21.10.2011 US 201161550165 P

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

22.03.2018

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**UBAYASENA, LASANTHA, CHANDANA;
EHLERT, ZOE y
CHANNABASAVARADHYA, CHANDRA,
SHEKARA A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 365 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

Método para determinar la cigosidad del gen *fad2* en canola usando PCR de punto final

Campo de la invención

5 Esta solicitud se refiere a un método para determinar la cigosidad de una planta de canola que comprende un gen *fad-2*, en donde los cebadores específicos y las sondas se usan en un ensayo PCR Taqman®.

Antecedentes de la descripción

10 El género *Brassica* incluye a la canola, uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo, y un importante cultivo de semillas oleaginosas en las zonas templadas. La canola se ha caracterizado tradicionalmente como *Brassica napus* L. (una especie derivada como resultado de cruces interespecíficos de *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*) en la que el ácido erúxico y los glucosinolatos se han eliminado o reducido significativamente a través de la reproducción convencional. La mayoría del aceite de canola se encuentra en forma de aceites vegetales producidos para el consumo humano. También hay un mercado en crecimiento para el uso de aceite de canola en aplicaciones industriales.

15 El género *Brassica* está compuesto por tres especies diploides, cada una de las cuales posee un genoma único que se etiqueta como el genoma A, el genoma B o el genoma C. Las plantas de *Brassica rapa* poseen un genoma diploide A. Las plantas de *Brassica nigra* poseen un genoma B diploide. *Brassica oleracea*, plantas que poseen un genoma C diploide. Los híbridos de estas especies se pueden producir a través del cruce entre dos de las especies diploides. La canola es una especie anfídiploide que se considera que surgió de la hibridación de *Brassica oleracea*, que tiene un genoma C diploide, y *Brassica rapa*, que tiene un genoma diploide A. La investigación citogenética reveló que los genomas de AA y CC muestran un grado de relación, siendo parcialmente homólogos entre sí y se cree que se han derivado de un genoma ancestro común (Prakash e Hinata, 1980). Aunque técnicamente se clasifican como diploides, los genomas de ambas especies progenitoras contienen un alto porcentaje de regiones duplicadas entre sí (Song et al, 1991). El análisis genético reveló que el genoma de AA de *Brassica rapa* aportó diez cromosomas a *Brassica napus*, mientras que *Brassica oleracea* aportó nueve cromosomas a partir de su genoma de CC como donante materno (Song et al, 1992).

20 La calidad del aceite comestible e industrial derivado de una variedad particular de semillas de canola está determinada por sus ácidos grasos constituyentes, ya que el tipo y la cantidad de insaturación de ácidos grasos tiene implicaciones tanto para la dieta como para las aplicaciones industriales. El aceite de canola convencional contiene aproximadamente 60% de ácido oleico (C18:1), 20% de ácido linoleico (C18:2) y 10% de ácido linolénico (18:3). Los niveles de ácido linolénico poliinsaturado típicos de la canola convencional son indeseables ya que el aceite se oxida fácilmente, la tasa de oxidación se ve afectada por varios factores, incluida la presencia de oxígeno, la exposición a la luz y el calor y la presencia de antioxidantes nativos o añadidos y pro-oxidantes en el aceite. La oxidación causa sabores desagradables y ranciedad como resultado de freír repetidamente (oxidación inducida) o almacenar durante un período prolongado (autooxidación). La oxidación también puede alterar las propiedades lubricantes y viscosas del aceite de canola.

30 Los perfiles del aceite de canola que exhiben niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados y mayores niveles de ácido oleico monoinsaturado en relación con el aceite de canola convencional están asociados con una mayor estabilidad oxidativa. La susceptibilidad de los ácidos grasos individuales a la oxidación depende de su grado de insaturación. Por lo tanto, la tasa de oxidación del ácido linolénico, que posee tres enlaces dobles carbono-carbono, es 25 veces mayor que la del ácido oleico, que tiene solo un doble enlace carbono-carbono, y 2 veces la del ácido linoleico, que tiene dos enlaces dobles de carbono-carbono. Los ácidos linoleico y linolénico también tienen el mayor impacto en el sabor y el olor porque forman fácilmente hidroperóxidos. El aceite de alto contenido de ácido oleico (70% de ácido oleico) es menos susceptible a la oxidación durante el almacenamiento, la fritura y el refinado, y puede calentarse a una temperatura más alta sin hacer humo, lo que lo hace más adecuado como aceite de cocina.

45 La calidad del aceite de canola está determinada por sus ácidos grasos constituyentes, tales como el ácido oleico (C18:1), el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3). La mayoría de los cultivares de canola normalmente producen aceite con aproximadamente 55-65% de ácido oleico y 8-12% de ácido linolénico. Las altas concentraciones del ácido linolénico conducen a una inestabilidad del aceite y a un sabor raro, mientras que los altos niveles del ácido oleico aumentan la estabilidad oxidativa y el valor nutricional del aceite. Por lo tanto, el desarrollo de cultivares de canola con ácido oleico incrementado y ácido linolénico reducido es altamente deseable para la calidad del aceite de canola.

50 Se identificaron dos loci y se mapeó su ubicación genómica a partir de un cultivar de canola que posee un aumento de ácido oleico y cantidades reducidas de ácido linolénico. Un locus tiene un efecto importante, y el segundo locus tiene un efecto menor sobre la producción de ácido oleico incrementado y ácido linoleico reducido. Se determinó que el locus principal para el ácido oleico alto (C18:1) era el gen de la desaturasa-2 de ácido graso (*fad-2*) y se localiza en el grupo de enlace, N5. El segundo locus menor se encuentra en el grupo de vinculación N1. Un Loci de Rasgo Cuantitativo (QTL) para el ácido linolénico (C18:3) es el gen de la desaturasa-3 del ácido graso del genoma C (*fad-3c*) y está localizado en el grupo de enlace N14. El segundo QTL principal reside en el grupo de enlace N4 y es el

gen de la desaturasa-3 del ácido graso del genoma A (fad-3a). Las secuencias genómicas de los genes fad-2 y fad-3c se amplificaron y secuenciaron a partir de un mutante inducido por metanosulfonato de etilo (EMS) y un cultivar de canola silvestre. Una comparación de las secuencias alélicas mutantes y de tipo natural de los genes fad-2 y fad-3c reveló polimorfismos de nucleótido único (SNP) en los genes de las plantas mutadas de EMS. En base a las diferencias de secuencia entre los alelos mutantes y de tipo natural, se desarrollaron dos marcadores de SNP, correspondientes a las mutaciones del gen fad-2 y fad-3c (Hu et al., 2006).

Los métodos actuales para producir semillas híbridas de Brassica F₁ tienen limitaciones en términos de costo y pureza de la semilla. En general, estos métodos requieren líneas estables progenitoras de cultivo casi homocigóticas, casi incompatibles y autoincompatibles, cuyas líneas progenitoras de cultivo están disponibles solo después de la autopolinización repetida para generar líneas endogámicas. Además, la endogamia para desarrollar y mantener las líneas progenitoras se logra mediante técnicas intensivas en mano de obra, tales como la polinización de yemas, ya que los sistemas de producción de semillas híbridas de Brassica basados en rasgos autoincompatibles deben utilizar plantas fuertemente autoincompatibles. Las condiciones ambientales durante el proceso de cría, tales como la temperatura y la humedad, generalmente afectan al metabolismo de los lípidos de las plantas, lo que también afecta al nivel del contenido de ácidos grasos (Harwood, 1999). Por lo tanto, la variabilidad ambiental hace que la selección fenotípica de las plantas sea menos confiable. Deng y Scarth (1998) encontraron que el aumento en la temperatura posterior a la floración redujo significativamente los niveles de C18:3 y aumentó C18:1. Resultados similares fueron publicados en otros estudios (Yermanos y Goodin, 1965, Canvin, 1965).

El mejoramiento para variedades de bajo contenido linolénico es particularmente desafiante ya que el contenido de C18:3 es un rasgo multigénico y se hereda de forma recesiva con una heredabilidad relativamente baja. El análisis genético de una población derivada del cruce entre "Stellar" (que tiene un bajo contenido de C18:3 (3%)) y "Drakkar" (que tiene un nivel "convencional" de C18:3 (9-10%)) indicó que el rasgo bajo C18:3 fue controlado por dos loci principales con efectos aditivos designados como L1 y L2 (Jourden et al., 1996b). Se encontró que estos dos loci principales que controlan el contenido de C18:3 corresponden a dos genes de fad-3 (ácidos grasos desaturasa-3); uno ubicado en el genoma A (que proviene de Brassica rapa) y el otro en el genoma C (originario de Brassica oleracea) (Jourden et al., 1996; Barret et al., 1999).

Los rasgos que varían continuamente debido a influencias genéticas (aditivos, dominantes y epistáticos) y ambientales se conocen comúnmente como "rasgos cuantitativos". Los rasgos cuantitativos se pueden distinguir de los rasgos "cualitativos" o "discretos" en relación a dos factores: las influencias ambientales sobre la expresión génica que producen una distribución continua de fenotipos y el complejo patrón de segregación producido por la herencia multigénica. La identificación de una o más regiones del genoma vinculadas a la expresión de un rasgo cuantitativo condujo al descubrimiento de loci de rasgos cuantitativos ("QTL"). Thormann et al. (1996) mapearon dos QTL que explicaban el 60% de la varianza para el contenido linolénico, mientras que Somers et al. (1998) identificaron tres QTL que colectivamente explicaron el 51% de la variación fenotípica del contenido de C18:3. Chen y Beversdorf (1990) también mostraron un modelo aditivo de tres locus. Rucker y Robbelen (1996) indicaron que es probable que varios genes menores estén implicados en el paso de desaturación.

La heredabilidad para el contenido de C18:3 se estimó en 26-59% (Kondra y Thomas, 1975) (donde la variabilidad de la heredabilidad es una función de la genética en oposición a los factores ambientales). La complejidad de la herencia del ácido linolénico puede deberse al hecho de que el ácido linolénico se puede sintetizar a partir de la desaturación de C18:2 o la elongación de C16:3 (Thompson, 1983).

A diferencia del ácido linolénico, la herencia del ácido oleico es menos compleja y la heredabilidad del ácido oleico es relativamente alta. Se ha mostrado que el alto contenido de ácido oleico está controlado por un locus principal llamado gen fad2 (ácido graso desaturasa 2) que codifica la enzima responsable de la desaturación de ácido oleico a ácido linoleico (C18:2) (Tanhuanpaa et al., 1998; Schierholt y otros, 2001). Todas las copias génicas funcionales del gen fad2 que se han publicado y mapeado hasta la fecha se encuentran en el grupo de unión N5 originado en el genoma A (Scheffler et al., 1997; Schierholt et al., 2000). Chen y Beversdorf (1990) mostraron que la acumulación del ácido oleico estaba controlada por dos sistemas genéticos de segregación, uno que actúa sobre la elongación de la cadena y el otro que implica la desaturación. La heredabilidad para el contenido de C18:1 se estimó entre 53% y 78% (Kondra y Thomas 1975) y 94% (Schierholt y Becker, 1999), respectivamente. Debido a la mayor heredabilidad, la expresión del contenido de C18:1 está menos afectada ambientalmente y es relativamente estable (Schierholt y Becker, 1999).

En el germoplasma de canola Nexera™, se encuentra que de 1 a 2 genes controlan el contenido de C18:1 y que al menos 3 genes están implicados en la expresión de C18:3 (Nexera™ es una marca comercial de Dow AgroSciences, LLC). En las progenies segregantes, la distribución del contenido de C18:3 de la semilla es continua, lo que dificulta la identificación de clases genotípicas con niveles de C18:3 deseables. Además, hay una baja correlación en el contenido de ácidos grasos entre las plantas cultivadas en el invernadero (GH) y en el campo, lo que hace aún más difícil seleccionar de manera confiable las plantas de GH con niveles deseables de C18:3.

Se pueden usar varios métodos para detectar la presencia de un gen específico en una muestra de tejido vegetal. Un ejemplo es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que solapa la secuencia de ADN insertada y el ADN genómico adyacente a la

misma. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR monocatenario (un "amplicón") de la región de interés (es decir, un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfúrico, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se agregan individualmente y la incorporación da como resultado una señal de luz que se mide. Una señal de luz indica la presencia de la secuencia transgénica insertada/flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión de una o varias bases con éxito. (Esta técnica generalmente se usa para la secuenciación inicial, no para la detección de un gen específico cuando se conoce).

La polarización de fluorescencia es otro método que se puede usar para detectar un amplicón. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido para solapar el flanco genómico y la unión de ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida con el producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia transgénica insertada/flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión de base única con éxito.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias. Brevemente, las balizas moleculares comprenden una sonda de oligonucleótido FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) que puede diseñarse de manera que la sonda de FRET se solape con la genómica de flanco e inserte la unión de ADN. La estructura única de la sonda FRET da como resultado una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y atenuadores muy cerca. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación por PCR exitosa, la hibridación de la sonda de FRET con la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente y de extinción. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción genómica/transgénica flanqueante debido a la amplificación e hibridación exitosas.

Los ensayos de sonda de hidrólisis, también conocidos como PCR TaqMan® (TaqMan® es una marca comercial registrada de Roche Molecular Systems, Inc.), proporcionan un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, la PCR TaqMan® utiliza una sonda de oligonucleótido FRET que está diseñada para tener una porción del oligo dentro del transgén y otra porción del oligo dentro de la secuencia genómica flanqueante para la detección específica del evento. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda de FRET y la posterior digestión durante la etapa de amplificación de la PCR debido a la actividad de exonucleasa 5' de la polimerasa de Taq, da como resultado la escisión y la liberación del resto fluorescente del resto atenuador en la sonda de FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción flanqueante/transgénica debido a una hibridación y amplificación exitosas.

También son útiles los marcadores moleculares para la identificación específica de secuencia de ADN. La selección del marcador molecular se basa en genotipos y, por lo tanto, es independiente de los efectos del entorno. Los marcadores moleculares ayudan a aliviar el problema de la selección no confiable de plantas en el invernadero atribuible a la baja correlación en el contenido de ácidos grasos entre las plantas cultivadas en invernadero y las plantas cultivadas en el campo. Significativamente, los marcadores moleculares estrechamente ligados a los genes que controlan los contenidos de C18:1 y C18:3 pueden facilitar la selección temprana de plantas portadoras de genes para C18:1 alto y C18:3 bajo. La selección asistida por marcadores en las primeras etapas puede ayudar a ahorrar espacio en el invernadero, mejorar la eficiencia del uso del invernadero y reducir la carga de trabajo de la reproducción en el campo.

De manera más general, los marcadores moleculares tienen ventajas respecto a los marcadores morfológicos en que: los marcadores moleculares pueden ser altamente polimórficos, mientras que los marcadores morfológicos son estrictamente dependientes del fenotipo; los marcadores morfológicos pueden interferir en la puntuación de ciertos fenotipos cuantitativos, mientras que los marcadores moleculares exhiben una relación 1:1 entre el genotipo y el fenotipo (lo que permite la calificación inequívoca de todos los genotipos posibles para un locus dado); y las interacciones epistáticas tienden a limitar el número de marcadores morfológicos útiles en una población, mientras que los marcadores moleculares no interactúan epistáticamente.

Diferentes tipos de marcadores moleculares, tales como los marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) (Tanhuanpaa et al., 1995; Hu et al., 1995; Rajcan et al., 1999; Jourdren et al., 1996), marcadores RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción) (Thormann et al., 1996) y marcadores SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia) (Hu et al., 1999) han sido identificados como asociados con bajos niveles de C18:3 en *Brassica napus*. También se han identificado marcadores moleculares para un alto contenido de C18:1. Se identificó que un marcador RAPD estaba relacionado con el QTL que afectaba a la concentración de ácido oleico en la nabina de primavera (*B. rapa* ssp. *Oleifera*) y luego se convirtió en un marcador SCAR (Tanhuanpaa et al., 1996). Schierholt et al. (2000) identificaron tres marcadores AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado) vinculados a una mutación alta de ácido oleico en colza de invierno (*B. napus* L.).

Tanhuanpaa et al. (1998) desarrollaron un marcador de PCR específico de alelo para el ácido oleico comparando el alelo de tipo natural y alto oleico del locus del gen fad2 en rábano de primavera (*B. rapa* ssp. *Oleifera*). Sin embargo, la mayoría de estos marcadores son marcadores de bajo rendimiento, tales como RAPD, AFLP y RFLP y no son adecuados para el cribado a gran escala a través de la automatización.

5 Breve compendio de la descripción

La presente descripción se refiere a ensayos de PCR TaqMan® de punto final para la detección, y análisis de cigosidad de alto rendimiento, del gen fad-2 en canola, como se define en las reivindicaciones. La presente descripción se refiere además, en parte, al uso del gen de fad-2 silvestre en canola como referencia para su uso en la determinación de la cigosidad. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden usar para identificar de manera única la cigosidad y la variedad de líneas de canola que comprenden el gen objeto.

La presente descripción también proporciona kits relacionados para determinar la cigosidad y la variedad de una muestra (de canola, por ejemplo).

Por lo tanto, una realización de la presente descripción se refiere a una PCR de TaqMan®, una plataforma flexible para determinar la cigosidad de alto rendimiento y el análisis de cultivo. La utilización de la aplicación de PCR TaqMan® de punto final presentada en este documento proporciona una aplicación fiable, precisa y de alto rendimiento para la cigosidad de fad-2 y el análisis de cultivo de la canola. De acuerdo con la invención, se usan cebadores específicos y sondas en dicho método de análisis.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una sección de la secuencia del gen fad-2 (SEQ ID NO: 1) que ilustra la posición de la mutación fad-2c identificada por Hu et al. (2006).

La Figura 2 es un ejemplo de los resultados del análisis de cigosidad (de canola), mostrando tres genotipos fad-2 después de un ensayo de punto final TaqMan® (resultados generados usando el software SDS 2.4 disponible a través de Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 proporciona una sección de la secuencia del gen fad-2 que ilustra la posición de la mutación fad-2c.

La SEQ ID NO: 2 proporciona el cebador directo D-CL-FAD2-F (que se une a la secuencia genómica flanqueante).

La SEQ ID NO: 3 proporciona el cebador inverso D-CL-FAD2-R2 (que une la secuencia de inserción).

La SEQ ID NO: 4 proporciona la sonda D-CL-FAD2-VIC para la unión preferencial del gen fad-2 mutado que tiene un polimorfismo de un solo nucleótido C a T.

La SEQ ID NO: 5 proporciona la sonda D-CL-FAD2-FAM para la detección del gen fad-2 de tipo natural.

Descripción detallada de la descripción

La presente descripción se refiere en parte a los ensayos de PCR TaqMan® de punto final para la detección y el análisis de cigosidad de alto rendimiento del gen fad-2 en canola, como se define en las reivindicaciones. La presente descripción se refiere, en parte, al uso del gen fad-2 tipo silvestre en canola como referencia para su uso en la determinación de la cigosidad. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden usar para identificar de manera única la cigosidad y variedad de líneas de canola que comprenden el gen objeto. De acuerdo con la invención, se usan cebadores específicos y sondas en dicho método de análisis. La presente descripción también proporciona kits relacionados para determinar la cigosidad y la variedad de una muestra (de canola, por ejemplo). Por lo tanto, una realización de la presente descripción se refiere a la PCR TaqMan®, una plataforma flexible para determinar la cigosidad de alto rendimiento y el análisis del cultivo. La utilización de la aplicación de PCR TaqMan® de punto final con los cebadores y las sondas presentada en este documento proporciona una aplicación fiable, precisa y de alto rendimiento para la cigosidad de fad-2 y el análisis del cultivo de la canola.

Se desarrollaron nuevos ensayos de la presente invención basados en parte en una mutación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del alelo fad-2 publicado por Hu et al. (2006). El ensayo utiliza dos regiones de cebador y dos sondas MGB para detectar alelos de fad-2 mutantes y de tipo natural (véase la Tabla 1). Los cebadores y sondas TaqMan® para detectar esta mutación SNP fueron diseñados en parte por el software Primer express (Applied Biosystems, Austin, Tx) usando las secuencias del gen fad-2. Este nuevo ensayo fad-2 TaqMan® se validó utilizando ADN extraído de plantas de canola que son homocigóticas, hemicigóticas y de tipo natural (sin mutación) para el gen fad-2. El ensayo fad-2 TaqMan® también se optimizó para el rendimiento en parte con el sistema de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems en los formatos de 96 ó 384 pocillos utilizando condiciones rápidas de ciclado térmico de PCR.

Tabla 1. Secuencias de cebador y sonda usadas en el ensayo TaqMan® de fad-2

SEQ ID NO:	Oligo	Nombre	Secuencia (5'-3')
SEQ ID NO: 2	Cebador directo	D-CL-FAD2-F	AGACGTTGAAGGCTAAGTACAAAGG
SEQ ID NO: 3	Cebador inverso	D-CL-FAD2-R2	GGCAAGTACCTCAACAACCCT
SEQ ID NO: 4	Sonda para detectar el mutante	D-CL-FAD2-VIC	VIC-ATGTTAACGGTTTAGTTCAC-MGB
SEQ ID NO: 5	Sonda para detectar el tipo silvestre	D-CL-FAD2-FAM	6FAM-TTAACGGTTCAGTTCAC-MGB

Se usaron muestras de hojas NEX845 y Quantum en el ensayo. El ADN de las poblaciones de cultivo de canola se usó para validar este ensayo.

5 Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos de diseño y/o producción de moléculas de ácido nucleico de diagnóstico ejemplificadas y/o sugeridas en este documento. Se diseñaron cebadores y sondas TaqMan® específicos, como se detalla en este documento, de acuerdo con las secuencias de ADN localizadas, o en las proximidades cadena arriba o cadena abajo, en los SNP específicos identificados en este documento en el gen fad-2.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a la determinación de la cigosidad de plantas productoras de aceite de canola. La presente descripción se refiere en parte a la detección de la presencia de SNP identificados en este documento, con el fin de determinar si la progenie de un cruce sexual contiene los SNP de interés, y la cigosidad de la progenie. Además, se incluyen métodos para detectar la cigosidad y que son útiles, por ejemplo, para cumplir con las reglamentaciones que requieren la aprobación previa al mercado y el etiquetado de alimentos derivados de plantas de cultivo recombinantes.

15 La descripción de la invención se refiere a un ensayo de PCR TaqMan® de punto final basado en fluorescencia que utiliza el gen fad-2 endógeno no mutante como control para el análisis de cigosidad de alto rendimiento de plantas de canola.

20 La presente descripción también se refiere en parte al desarrollo de una PCR TaqMan® de punto final bplex para el análisis de cigosidad de canola. Además, la presente descripción se refiere en parte al desarrollo de kits de prueba de cultivo de genes de canola fad-2.

25 En general, los ensayos TaqMan® de punto final se basan en una estrategia más/menos, por la cual un "más" significa que la muestra es positiva para el gen ensayado y un "menos" significa que la muestra es negativa para el gen ensayado. Estos ensayos utilizan típicamente un conjunto de cebadores oligonucleotídicos y dos sondas oligonucleotídicas, una sonda híbrida preferentemente con el SNP fad-2 mutado y la otra sonda híbrida preferentemente con la secuencia fad-2 de tipo natural, respectivamente.

30 Las ventajas asociadas con la presente descripción incluyen su menor dependencia en la calidad y cantidad del ADN. Además, la presente descripción no requiere ninguna etapa de desnaturalización inicial larga que, si no se maneja adecuadamente, a menudo puede hacer que otros ensayos de detección de SNP no tengan éxito. Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para analizar de manera eficiente grandes cantidades de muestras de canola de una manera de alto rendimiento dentro de un entorno comercial. Otra ventaja de la presente descripción es el ahorro de tiempo. El análisis TaqMan® de punto final objeto para detectar la cigosidad de canola y el análisis del cultivo ofrece ventajas respecto a otros formatos de aplicación, particularmente al analizar grandes cantidades de muestras.

35 Esta descripción se refiere en parte al análisis del cultivo de plantas. Esta descripción incluye la detección novedosa de SNP de plantas de canola que afectan a los niveles de ácido oleico y linolénico en las plantas en cuestión.

40 Además, puede ser posible detectar la presencia de los SNP objetos mediante otros métodos conocidos de detección de ácidos nucleicos, tales como PCR o hibridación de DNA usando las sondas de ácido nucleico descritas en este documento. Ensayos de PCR específicos de eventos se discuten en este documento. (Véase también Windels et al. (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b: 459462, 1999).

Como se usa en el presente documento, el término "progenie" denota la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora.

45 Las técnicas de detección de la presente descripción son especialmente útiles junto con el cultivo de plantas, por ejemplo, para determinar la cigosidad de plantas de progenie después de que una planta progenitora que comprende un SNP de interés se cruce con otra planta. La aplicación y los métodos objeto benefician a los programas de mejora del cultivo de canola, así como a los procesos de control de calidad. Los kits de detección de PCR para líneas de canola, que usan los métodos y ensayos descritos en este documento ahora se pueden

preparar y usar. Además, la presente descripción puede beneficiar el registro del producto y la administración del producto.

Una planta de canola que comprende la composición genética de fad-2 deseada puede criarse cruzando primero sexualmente una primera planta progenitora de canola que consiste en una planta de canola cultivada a partir de semillas de cualquiera de las líneas mencionadas en este documento, y una segunda planta progenitora de canola, produciendo así una pluralidad de primeras plantas de progenie; y luego seleccionando una primera planta de progenie que posee los genes fad-2 deseados como se describe por la presente descripción; y autopolinizando la primera planta de progenie, produciendo de este modo una pluralidad de plantas de segunda progenie; y luego seleccionando de las plantas de la segunda progenie una planta que posea los genes fad-2 deseados de acuerdo con la presente descripción. Estos pasos pueden incluir además el retrocruzamiento de la primera planta de progenie o la segunda planta de progenie a la segunda planta progenitora de canola o una tercera planta progenitora de canola. Una cosecha de canola que comprende semillas de canola de la presente descripción, o progenie de la misma, puede luego sembrarse.

Esta descripción incluye además procesos para preparar cruces usando una planta de canola que comprende la composición genética de fad-2 deseada como al menos un progenitor. Por ejemplo, la presente descripción incluye una planta híbrida F_1 que tiene como uno o ambos progenitores cualquiera de las plantas de canola que comprenden la composición genética fad-2 deseada. También dentro de la presente descripción, es producida por semillas por tales híbridos F_1 . Esta descripción incluye un método para identificar una semilla híbrida F_1 cruzando una planta ejemplificada con una planta diferente (por ejemplo, progenitora endogámica) y recolectando y ensayando la semilla híbrida resultante, usando el método de la presente descripción. Las plantas de canola que se usan para producir el híbrido F_1 pueden ser progenitores femeninos o progenitores masculinos.

También debe entenderse que pueden producirse plantas transgénicas que contengan los genes fad-2 descritos en este documento. Adicionalmente, pueden cruzarse plantas transgénicas que comprenden las características del gen fad-2 descritas en la presente memoria con una planta que comprende una composición genética diferente, produciendo así una descendencia que contiene genes exógenos que segregan de forma independiente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que sean homocigóticas para los genes exógenos añadidos. También se contempla el retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento externo con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Se conocen en la técnica otros métodos de cultivo comúnmente usados para diferentes características y cultivos. El cultivo por retrocruzamiento se ha utilizado para transferir genes para un rasgo simple de introgresión y altamente heredable en un cultivar homocigótico deseable o línea endogámica, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo a transferir se llama progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (p. ej., cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante. Después del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y cruzan repetidamente (retrocruzan) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseado transferido del progenitor donante. El método de la presente descripción proporciona un ensayo de PCR TaqMan® de punto final basado en fluorescencia de alto rendimiento para detectar el transgén fad-2 en plantas de progenie y para determinar el nivel de cigosidad de las plantas de progenie.

Los métodos de la presente descripción, por ejemplo, los cebadores y sondas de oligonucleótidos, pueden usarse como métodos de selección asistida por marcadores (MAB). Los métodos de la presente descripción, por ejemplo, los cebadores y sondas de oligonucleótidos, pueden usarse con ensayos relacionados (tales como, ensayos de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados AFLP (AFLP), ensayos de polimorfismos de longitud de fragmentos restrictivos (RFLP), ensayos de ADN de polimorfismos amplificados aleatorios (RAPD),) que identifican rasgos agrónomicamente útiles genéticamente relacionados mediante la detección de SNP o repeticiones de secuencia simple (SSR), usando protocolos disponibles públicamente que son conocidos en la técnica. Los SNP descritos en la presente memoria pueden rastrearse en la progenie de un cruce con una planta de canola de la presente descripción (o progenie de la misma y cualquier otra variedad o cultivar de canola) usando los métodos MAB. Las moléculas de ADN pueden usarse como marcadores para este rasgo y los métodos MAB, que son bien conocidos en la técnica, pueden usarse para rastrear los SNP en plantas de canola en las que al menos una planta de canola de la presente descripción, o progenie de la misma, era un progenitor o antepasado. Los métodos de la presente descripción se pueden usar para identificar cualquier variedad de canola que tenga los SNP objetos descritos en este documento.

Los métodos de la presente descripción incluyen un método para producir una planta de canola que comprende una combinación de los SNP identificados en la presente memoria, en donde dicho método comprende el cultivo con una planta de la presente descripción. Más específicamente, dichos métodos pueden comprender el cruce de dos plantas de la presente descripción, o una planta de la presente descripción y cualquier otra planta. Los métodos ejemplares pueden comprender además la selección de la progenie de dicho cruzamiento analizando dicha progenie para un SNP de la presente descripción, detectable de acuerdo con la descripción del sujeto. Por ejemplo, la presente descripción se puede usar para seguir la cigosidad de las plantas de canola a través de ciclos de cultivo con plantas que comprenden otros rasgos deseables, tales como rasgos agrónomicos tales como los que se analizan en la presente memoria en los diversos Ejemplos. Las plantas que comprenden los SNP objetos y los rasgos deseados también se pueden detectar, identificar, seleccionar y usar rápidamente en rondas posteriores de

cultivo, por ejemplo. Los SNP/rasgos en cuestión también se pueden combinar a través de la cría, y rastrearse de acuerdo con la presente descripción, con otros rasgos, por ejemplo, rasgo(s) resistente(s) a insectos y/o rasgos de tolerancia a herbicidas. Una realización de esta última es una planta que comprende uno o más de los SNP objetos combinados con un gen que codifica resistencia a un herbicida tal como el glifosato.

- 5 La presente descripción incluye secuencias de ADN que comprenden un fragmento contiguo útil como secuencias de cebador para la producción de un producto de amplificación diagnóstico para una o más de las plantas de canola de fad-2.

Las realizaciones relacionadas pertenecen a secuencias de ADN que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos contiguos de una porción de secuencias de ADN de fad-2 identificadas en este documento, o complementos de las mismas. Dichas secuencias pueden ser útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos usando estos cebadores pueden ser diagnósticos para cualquier combinación y cigosidad de las variedades de canola fad-2 a las que se hace referencia en este documento. Por lo tanto, la descripción también incluye los amplicones producidos por tales cebadores de ADN y cebadores homólogos.

15 En aún otras realizaciones, la presente descripción incluye métodos para producir los SNP fad-2 de la presente descripción, en donde dicho método comprende las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea progenitora de canola que comprende uno de los SNP descritos en este documento y conferir una de las características de ácido oleico y/o linolénico descritas en este documento y una segunda línea de canola progenitora (que carece de estos SNP) produciendo de este modo una pluralidad de plantas de progenie; y (b) seleccionar una planta de progenie mediante el uso de marcadores moleculares. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retrocruzar la planta de progenie con la segunda línea de canola progenitora para producir una planta de canola homocigota o de cultivo confirmado que comprenda dichos rasgos de fad-2.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruce con dichas plantas de canola de fad-2. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de canola, con un conjunto de cebadores de la presente descripción. Dichos cebadores, cuando se utilizan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de al menos una de dichas plantas de canola, producen un primer amplicón que es diagnóstico de al menos uno de dichos SNP de canola de fad-2 o genes de tipo natural. Dichos métodos comprenden además realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo el primer amplicón y detectando el primer amplicón con sondas específicas para los SNP del fad-2 descrito en este documento y los genes de tipo natural. Los métodos comprenden además realizar aplicaciones de fusión de discriminación alélica de los amplicones que tienen las sondas descritas hibridadas a la misma, y comparar la fluorescencia relativa de las sondas usadas en la aplicación de fusión de discriminación alélica (por ejemplo, a la fluorescencia de muestras de control conocidas, por ejemplo). La fluorescencia relativa de las sondas indica si la muestra contiene el SNP de interés, y si es así, si la muestra es heterocigótica u homocigota para el SNP.

Los kits de detección de ADN pueden desarrollarse usando las composiciones descritas en este documento, junto con métodos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del presente SNP de canola en una muestra y pueden aplicarse a métodos para la cría de plantas de canola que contienen este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias a los amplicones, por ejemplo, descritos en este documento. Estas secuencias de ADN pueden usarse en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la realización del método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la que está unida un marcador detectable convencional o molécula indicadora (tal como un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima). Dicha sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente descripción, a una cadena de ADN genómico de una de dichas plantas de canola que comprenden los genes de interés fad-2, ya sea de una planta de canola o de una muestra que incluya el ADN del evento. Las sondas según la presente descripción incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y pueden usarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Se diseñaron sondas específicas que comprendían un indicador fluorescente (fluoróforo) y un inhibidor que se hibrida con el ADN diana entre los cebadores de PCR. La molécula de fluoróforo se agrega a una sonda de oligonucleótido durante la síntesis de la sonda de oligonucleótido marcando con ello la sonda de oligonucleótido.

Se pueden agregar otras moléculas a la sonda de oligonucleótidos, tal como una molécula inhibidora. La adición de estas moléculas a una sonda de oligonucleótidos no altera la función de la sonda de oligonucleótidos cuando se hibrida con ADN monocatenario y produce una nueva cadena de ADN a través de un proceso de amplificación.

Se han desarrollado numerosos fluoróforos que se excitan a longitudes de onda específicas y son conocidos en la técnica. La excitación del fluoróforo da como resultado la liberación de una señal fluorescente por el fluoróforo que

puede ser inactivada por un inhibidor localizado cerca del fluoróforo. Cuando el inhibidor se desasocia del fluoróforo, la señal fluorescente ya no se inhibe y la acumulación de la señal fluorescente, que se correlaciona directamente con la cantidad de ADN objetivo, se puede detectar a tiempo real con un sistema fluorómetro automatizado. Pueden usarse fluoróforos en combinación, en donde los espectros de excitación y emisión son significativamente diferentes para permitir la detección múltiple de dos o más fluoróforos. Algunas realizaciones preferidas de fluoróforos incluyen; un colorante fluorescente HEX, un colorante fluorescente TET, un colorante fluorescente Cy3, un colorante fluorescente Cy 3.5, un colorante fluorescente Cy 5, un colorante fluorescente Cy 5.5, un colorante fluorescente Cy 7 o un colorante fluorescente ROX. Una realización preferida de un fluoróforo para su uso con el método que consiste en un sistema de detección de ensayo homogéneo para un proceso PCR que usa FRET de la presente invención incluye un colorante fluorescente FAM de un colorante fluorescente JOE.

Se han desarrollado inhibidores para extinguir fluoróforos a una longitud de onda específica y son conocidos en la técnica. Cuando el inhibidor está ubicado en estrecha aproximación al fluoróforo, el fluoróforo transfiere energía al inhibidor. El inhibidor transfiere esta energía y regresa a un estado fundamental natural a través de la decadencia de emisión o no radiactivamente. En la decadencia no radiactiva u oscura, la energía transferida desde el fluoróforo se desprende como vibraciones moleculares. La selección de los inhibidores es considerada a partir de cualidades tales como la baja fluorescencia de fondo, una alta sensibilidad y la superposición espectral máxima para proporcionar un inhibidor que pueda permitir un uso más amplio de fluoróforos. Algunas realizaciones preferidas de inhibidores incluyen; inhibidores Dabcyl, inhibidores Tamra, inhibidor Qxl, inhibidor Iowa black FQ, inhibidor Iowa black RQ, o un inhibidor IR Dye QC-1. Una realización especialmente preferida de un inactivador incluiría un inhibidor Blackhole marcado en un cebador oligonucleotídico que está diseñado como antisentido para el oligonucleótido marcado con FAM.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados/sintetizados que se hibridan con una cadena de ADN diana complementaria mediante la hibridación del ácido nucleico, formando así un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana y luego extendiéndose a lo largo de la cadena de ADN diana mediante una polimerasa, p. ej. ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente descripción se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y los cebadores generalmente son 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 polinucleótidos o más de longitud. Tales sondas y cebadores se hibridan específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferiblemente, las sondas y cebadores de acuerdo con la presente descripción tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana y que conservan la capacidad de hibridarse con las secuencias diana se pueden diseñar por métodos convencionales.

Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1 -3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los pares PCR-cebador pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a tal fin.

Los cebadores y las sondas basadas en las secuencias de ADN cadena arriba y cadena abajo de los SNP descritos en la presente memoria se pueden usar para confirmar (y, si es necesario, corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante re-clonación y secuenciación de tales secuencias.

Las sondas y los cebadores de ácido nucleico de la presente descripción se hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. En general, puede usarse cualquier método de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de una muestra de fad-2. Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las mismas son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si exhiben una complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que se mantengan unidas entre sí en condiciones convencionales de "baja restricción". De forma similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que se mantengan unidas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones convencionales de rigurosidad se describen en Sambrook et al., 1989. Por lo tanto, se permiten las desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en la secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas.

Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico a la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. La expresión "condiciones rigurosas" se define funcionalmente con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico diana (es decir, a una secuencia particular de interés de ácido nucleico) mediante el procedimiento de hibridación específico discutido en Sambrook et al., 1989, en 9.52-9.55. Véase también, Sambrook et al., 1989 en 9.47-9.52 y 9.56-9.58. En consecuencia, las secuencias de nucleótidos de la descripción se pueden usar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden usar condiciones variables de hibridación para lograr grados variables de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren alta selectividad, típicamente se emplearán condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán condiciones de sal y/o temperatura relativamente bajas, tales como las proporcionadas por aproximadamente de 0,50 mM a aproximadamente 2,00 mM de $MgCl_2$ a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 75°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o bien la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras que la otra variable cambia. Tales condiciones selectivas toleran poco desajuste entre la sonda y la plantilla o cadena diana, si es que hubiera alguno.

La detección de las secuencias de ADN mediante la hibridación es bien conocida por los expertos en la técnica, y las enseñanzas de las patentes de Estados Unidos números 4.965.188 y 5.176.995 son ejemplos de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización a modo de ejemplo, un ácido nucleico de la presente descripción se hibridará específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificados o sugeridos en la presente memoria, incluyendo complementos y fragmentos de los mismos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente descripción, una molécula marcadora de ácido nucleico de la presente descripción tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en este documento en una de las secuencias ejemplificadas, o complementos y/o fragmentos de la misma.

En otro aspecto de la presente descripción, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente descripción comparte entre el 80% y el 100% o el 90% y el 100% de identidad de secuencia con tales secuencias de ácido nucleico. En un aspecto adicional de la presente descripción, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente descripción comparte entre 95%, 96%, 97%, 98% y/o 99% y 100% de identidad de secuencia con dicha secuencia. Dichas secuencias pueden usarse como marcadores en métodos de fitomejoramiento para identificar la progenie de cruces genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica; estos pueden incluir, aunque sin limitación, marcadores fluorescentes, marcadores radioactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride principalmente y con una alta preferencia por sus secuencias de ácido nucleico diana, lo que permite que el par de cebadores se una y, preferiblemente, produzca un amplicón único.

El término "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o cebador se hibrida, en condiciones de hibridación rigurosas, principalmente con, y con una alta preferencia para, la secuencia de ácido nucleico en una muestra que comprende la secuencia diana.

Como se usa en el presente documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de canola que resulta de un cruce sexual contiene un SNP de interés como se describe en este documento. El ADN extraído de una muestra de tejido de planta de canola puede someterse a un método de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de una secuencia cadena arriba o cadena abajo en el genoma de la planta de canola adyacente al sitio SNP y un segundo cebador derivado del otro extremo de la secuencia cadena arriba o cadena abajo en el genoma de la planta de canola adyacente al sitio SNP produciendo de este modo un amplicón que es diagnóstico por la presencia del SNP. El amplicón es de una longitud y tiene una secuencia que también es diagnóstica para el gen *fad-2* de tipo natural o mutado. El amplicón puede variar en longitud a partir de la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, y/o la longitud combinada de los pares de cebadores más aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 o más pares de bases de nucleótidos (más o menos cualquiera de los incrementos enumerados anteriormente). Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta se puede ubicar a una distancia de la secuencia de SNP. Esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótidos hasta aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebador que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluida la PCR. Se conocen en la técnica una variedad de métodos de amplificación y se describen, entre otros, en la patente de los Estados Unidos N° 4.683.195 y la patente de los Estados Unidos N° 4.683.202. Los métodos de amplificación por PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb del ADN genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN, pueden usarse en la práctica de la presente descripción. La secuencia de un SNP *fad-2* se puede verificar amplificando dichas secuencias usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en este documento seguido de secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido por estos métodos se puede detectar mediante una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio es un método común bien conocido para detectar amplicones de ADN. Otro método de este tipo es el Análisis de Cadenas Genéticas en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto a la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente como a la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de la PCR monocatenario puede hibridarse con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una única reacción de extensión de base usando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la próxima base esperada. La lectura puede ser fluorescente o estar basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia de inserción/flanqueo debido a la amplificación, hibridación y extensión de la base única con éxito.

La PCR TaqMan® es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótido FRET que solapa un SNP de interés. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (al menos uno cadena arriba y al menos uno corriente abajo del SNP de interés) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP.

Después de la amplificación, el análisis de discriminación alélica (utilizando la sonda de hidrólisis TaqMan® descrita anteriormente) se puede realizar para determinar la presencia de un SNP de interés y la cigosidad de la muestra. Durante el análisis de discriminación alélica, dos sondas de hibridación diferentes (una sonda que incluye un nucleótido complementario a la secuencia de SNP y la otra sonda que tiene un nucleótido complementario a la

5 secuencia de tipo natural, cada sonda que comprende un fluoróforo diferente añadido) se hibridan con el amplicón y se digieren, liberando de este modo los restos atenuadores de la sonda debido a la actividad de exonucleasa 5' de la polimerasa taq y dando como resultado la fluorescencia. Una comparación de la fluorescencia relativa de una sonda específica para el gen de tipo natural frente a una sonda específica para el SNP proporciona una indicación de la presencia y cigosidad del SNP de interés.

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar procedimientos para poner en práctica la descripción y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la descripción. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan enfoques específicos utilizados para ilustrar los modos preferidos para su práctica.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Las siguientes abreviaturas se usan a menos que se indique lo contrario.

	bp	par de bases
	°C	grados Celsius
15	ADN	ácido desoxirribonucleico
	FRET	transferencia de energía de resonancia por fluorescencia
	DIG	digoxigenina
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	kb	kilobase
20	µg	microgramo
	µl	microlitro
	ml	mililitro
	M	masa molar
	OLP	sonda superpuesta
25	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	PTU	unidad de transcripción de la planta
	SDS	dodecil sulfato de sodio
	SNP	polimorfismo de nucleótido único
	SOP	procedimiento operativo estándar
30	SSC	una solución tampón que contiene una mezcla de cloruro sodio y citrato de sodio, pH 7,0
	TBE	una solución tampón que contiene una mezcla de base Tris, ácido bórico y EDTA, pH 8,3
	V	voltios

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo TAQMAN® de punto final de FAD-2

35 Se desarrolló un ensayo de punto final TaqMan® para detectar la mutación del SNP fad-2 y para determinar el estado de cigosidad de las plantas de canola que contienen la mutación del gen fad-2 en poblaciones reproductoras. Se diseñaron dos cebadores para unir secuencias de ADN altamente conservadas, localizadas aguas arriba y aguas abajo del gen fad-2. Estos cebadores amplificaron un fragmento de ADN de 91 pb que se extendió a través del SNP fad-2 en plantas de canola mutadas y no mutadas. La mutación de fad-2 en la canola está descrita en Hu et al. (2006) y se caracterizó como un SNP de citosina (C) a timina (T) localizado en la región de expresión del gen fad-2 (Fig. 1). Se diseñaron dos sondas TaqMan® inactivadoras no fluorescentes de unión de surco menor (MGBNFQ) con FAM y VIC como colorantes indicadores para detectar la presencia del gen fad-2 de tipo natural y el gen fad-2 mutado (que consiste en un SNP), respectivamente. Estas sondas se diseñaron para que comprendan una mayor especificidad (p. ej., tienen una afinidad mayor) para la detección del fad-2 de tipo natural y SNP de fad-2, respectivamente. El método de detección TaqMan® para plantas de canola que contienen el SNP de fad-2 se probó

contra la variedad de canola "NEX 828" (que contiene el SNP fad-2), la variedad de canola de control "Quantum" (que no contiene el SNP de fad-2) y una muestra de ADN aislada de plantas conocidas por ser heterocigotas para el SNP de fad-2. El ensayo TaqMan® de punto final se utilizó para determinar la presencia del SNP de fad-2 y también para determinar la cigosidad de las plantas que se están probando en una aplicación de alto rendimiento, por ejemplo, formatos de placas de 96 y 384 pocillos.

Ejemplo 1.1 Aislamiento de qPNA

En este estudio se analizaron muestras de ADN genómico (ADNg) de 625 plantas de canola diferentes que contenían el SNP fad-2 y plantas de canola de control (fad-2 de tipo natural). El ADNg se extrajo usando el kit de ADN de plantas Qiagen MagAttract modificado (Qiagen, Valencia, CA). Se utilizaron discos de hoja de canola nuevas, 4 por muestra, para la extracción del ADNg. El ADNg se cuantificó con el método Pico Green de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Molecular Probes, Eugene, OR). Las muestras se diluyeron con agua libre de DNasa dando como resultado una concentración de 5 ng/μl para el propósito de este estudio.

Ejemplo 1.2: Ensayo y resultados de TaqMan®

Se diseñaron cebadores y sondas TaqMan® específicos para su uso en un ensayo de punto final TaqMan®. Estos cebadores y sondas se diseñaron para amplificar y detectar la región del gen fad-2 que comprende el SNP de interés. Estos reactivos se pueden usar con las condiciones enumeradas a continuación para detectar el gen fad-2 mutado dentro de las plantas de canola. La Tabla 1 enumera las secuencias de cebador y sonda que se desarrollaron específicamente para la detección del SNP fad-2 en plantas de canola.

Tabla 1. Cebadores y sondas de la PCR de Taqman

SEQ ID NO:	Nombre	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 2	D-CL-FAD2-F	Cebador directo	AGACGTTGAAGGCTAAGTACAAAGG
SEQ ID NO: 3	D-CL-FAD2-R2	Cebador inverso	GGCAAGTACCTCAACAACCCT
SEQ ID NO: 4	D-CL-FAD2- VIC	Sonda para detectar el mutante	VIC-ATGTTAACGGTTTAGTTCAC-MGB
SEQ ID NO: 5	D-CL-FAD2-FAM	Sonda para detectar el tipo silvestre	6FAM-TTAACGGTTCAGTTCAC-MGB
SEQ ID NO: 6	Cebador inverso N° 2	D-CL-FAD2-R	CAAGTACCTCAACAACCCTTTGG

Las mezclas de reacción de PCR para la amplificación son las siguientes: 1 x TaqMan® GTEExpress Master Mix, 0,9 μM de cebador directo (SEQ ID NO: 2), 0,9 μl de cebador inverso (SEQ ID NO: 3), 0,2 μM de sonda mutante de FAD2 (SEQ ID NO: 4), sonda de tipo natural 0,2 μM (SEQ ID NO: 5), 15 ng de ADNg en una reacción total de 6 μl. La mezcla de reacción se amplificó usando las siguientes condiciones de ciclo térmico: dos etapas iniciales de 50°C durante 2 min y 95°C durante 30 segundos; seguido por 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 62°C. Las reacciones se mantuvieron a 10°C hasta que se eliminaron del termociclador. El ciclo térmico de la PCR se puede realizar utilizando el sistema de PCR en tiempo real ABI-Applied Biosystems 7900 HT o Applied Biosystems Verity thermal Cyclers (Life Technologies, Carlsbad, CA). Las placas de muestra consistían en ADN de control de plantas de canola que eran homocigóticas para el SNP fad-2 (NEX 828), heterocigotas para el SNP fad-2 u homocigotas para el tipo silvestre de fad-2 (Quantum). Además, se incluyó un control sin plantilla que no contenía ADN. Después de la amplificación, las señales fluorescentes del punto final (VIC y FAM) se leyeron utilizando el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900 HT de acuerdo con el procedimiento de lectura de la placa de discriminación alélica según lo descrito por el fabricante. Los datos fueron luego analizados utilizando el software SDS 2.4 (Life Technologies, Carlsbad, CA) para determinar la fluorescencia relativa de cada muestra (Fig. 2).

El método de detección TaqMan® para el SNP fad-2 en canola se probó frente a muestras conocidas homocigotas, hemocigóticas y de tipo natural. Un análisis de la fluorescencia producida por cada sonda (de la reacción de una muestra), con la fluorescencia producida por las sondas de los controles, ayuda a determinar la cigosidad de cada muestra. Se diseñaron dos cebadores inversos diferentes para el ensayo. El cebador D-CL-FAD2-R (SEQ ID NO: 6) no funcionó tan eficazmente como el cebador D-CL-FAD2-R2 (SEQ ID NO: 3). El cebador D-CL-FAD2-R2 (SEQ ID NO: 3) se unió al ADN genómico con más especificidad para una detección más robusta del SNP fad-2. Este ensayo demostró alta especificidad para la detección del SNP fad-2 y los genes de tipo natural en canola y no produjo ni amplificó ningún resultado falso positivo detectable de los controles. Estos cebadores y sondas se pueden usar para

la detección del gen SNP fad-2 y fad-2 tipo silvestre en canola y estas condiciones y reactivos son aplicables para los ensayos de cigosidad.

Listado de secuencias

- <110> Dow Agrosiences
- 5 <120> Método para determinar la cigosidad del gen FAD2 en Canola utilizando la PCR TAQMAN de punto final
 - <130> DAS-P0205-01-WO-E
 - <150> US 61/550,165
 - <151> 2011-10-21
 - <160> 5
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
 - <210> 1
 - <211> 180
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 - <223> Porción del gen canola fad-2, incluido el SNP
 - <400> 1

gagacgaagt gtttgtcccc aagaagaagt cagacatcaa gtggtacggc aagtacctca	60
acaacccttt gggacgcacc gtgatgttaa cggtttagtt cactctcggc tggcctttgt	120
acttagcctt caacgtctcg gggagacett acgacggcgg cttagcttgc catttccacc	180
 - <210> 2
 - <211> 25
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 - <223> cebador sintético
- 25 <400> 2
 - agacgtgaa ggctaagtac aaagg 25
 - <210> 3
 - <211> 21
 - <212> ADN
- 30 <213> secuencia artificial
 - <220>
 - <223> cebador sintético
 - <400> 3
 - ggcaagtacc tcaacaacct t 21
- 35 <210> 4
 - <211> 20
 - <212> ADN
 - <213> secuencia artificial
- 40 <220>
 - <223> sonda sintética
 - <400> 4
 - atgtaacgg ttagttcac 20
 - <210> 5
 - <211> 17
- 45 <212> ADN
 - <213> secuencia artificial

ES 2 660 365 T3

<220>

<223> sonda sintética

<400> 5

ttaacgggtc agtcac 17

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la cigosidad de una planta de canola que comprende un gen fad-2, comprendiendo dicho método:
- obtener una muestra de ADN genómico de dicha planta de canola;
- 5 producir una muestra de contacto poniendo en contacto dicha muestra de ADN genómico con un primer cebador y un segundo cebador, en donde dicho primer cebador consiste en SEQ ID NO:2 que une una región de dicho gen fad-2 corriente arriba de una ubicación de un polimorfismo de un solo nucleótido de interés, dicho segundo cebador consiste en SEQ ID NO:3 que une una región de dicho gen fad-2 secuencia abajo del polimorfismo de nucleótido único de interés, en el que dicho primer cebador y dicho segundo cebador producen un amplicón cuando se someten a condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
- 10 someter dicha muestra de contacto a condiciones de PCR, en donde se produce dicho amplicón;
- permitir que cada una de una primera sonda fluorescente, cuya secuencia consiste en SEQ ID NO:5, y una segunda sonda fluorescente, cuya secuencia consiste en SEQ ID NO:4, se hibriden con el amplicón durante un período de tiempo y a una temperatura entre 50-70 grados Celsius, hibridándose dicha primera sonda fluorescente con dicho amplicón cuando dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés no está presente en dicho amplicón, hibridándose dicha segunda sonda fluorescente preferentemente con dicho amplicón cuando dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés está presente en dicho amplicón;
- 15 aumentar dicha temperatura después del período de tiempo especificado en el paso de permitir;
- capturar dicha fluorescencia producida por cada una de dichas sondas primera y segunda durante la etapa de aumentar; y
- 20 determinar la cigosidad de dicha planta de canola, comprendiendo la etapa de determinar una comparación de la fluorescencia producida por cada una de las sondas primera y segunda, en donde la fluorescencia de las sondas primera y segunda refleja predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control positivo homocigótica de SNP que indica la presencia de dicho polimorfismo de nucleótido único de interés, reflejando la fluorescencia de las sondas primera y segunda predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control negativa homóloga de SNP, lo que indica una falta de la presencia de dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés y reflejando la fluorescencia de la primera y segunda sonda predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control positivo de SNP heterocigoto, lo que indica que dicha planta de canola comprende un primer alelo que incluye dicho polimorfismo de nucleótido único de interés y un segundo alelo que carece de dicho polimorfismo de nucleótido único de interés.
- 25
- 30
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método se usa para la verificación de la introgresión del cultivo de plantas de canola cruzadas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dichas sondas primera y segunda están marcadas tanto con un colorante fluorescente como con un inhibidor.
- 35
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha primera sonda comprende FAM como dicho colorante fluorescente en el extremo 5' de dicha primera sonda y un inactivador de MGB en el extremo 3' de dicha primera sonda.
5. El método de la reivindicación 3, en el que dicha segunda sonda está marcada con VIC en el extremo 5' de dicha segunda sonda y un inactivador de MGB en el extremo 3' de dicha segunda sonda.
- 40
6. El método de la reivindicación 1, en el que los resultados de fluorescencia de dicho método se leen directamente en un lector de placas.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de ADN se obtiene de una planta de canola en un campo.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de aumentar comprende el aumento de dicha temperatura en incrementos de temperatura sustancialmente uniformes por un período de tiempo.
- 45
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fluorescencia producida por cada una de dichas sondas primera y segunda durante la etapa de aumento se captura en la etapa de captura durante cada incremento de la etapa de aumento.
10. Un kit para realizar el método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho kit dicho primer cebador, dicho segundo cebador, dicha primera sonda y dicha segunda sonda, en el que dicho primer cebador consiste en SEQ ID NO: 2, dicho segundo cebador consiste en SEQ ID NO: 3, dicha primera sonda consiste en SEQ ID NO: 5, y dicha segunda sonda consiste en SEQ. ID NO: 4.
- 50

GAGACGAAGTGTTCCTCCCAAGAAGAAGTCAGACATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTC
AACAAACCCTTTGGGACGCACCGTGATGTAAACGGTT TAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTTG
TACTTAGCCTTCAACGTCCTCGGGGAGACCTTACGACGGGGCTTCGCTTGCCATTCCACC

↑
Fad2 mutation (T to C)

FIG. 1

Separación de la mutación del gen de fad-2 en 3 grupos – salida SDS 2.4

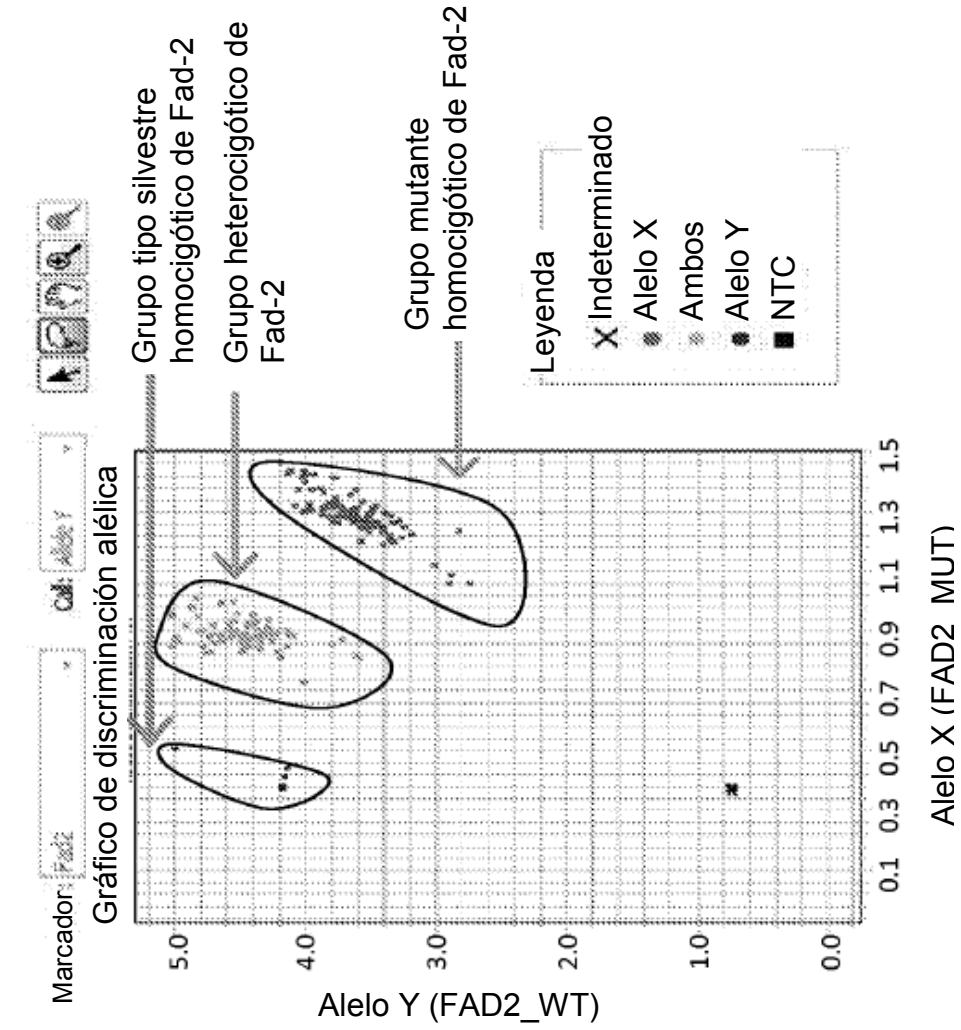


FIG. 2

Muestras de ADN en rejilla de placa

