

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 976**

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/US2012/061000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12841612 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2768984**

54 Título: **Método para determina la cigosidad del gen fad3 en canola**

30 Prioridad:  
**21.10.2011 US 201161550170 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.03.2018**

73 Titular/es:  
**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:  
**UBAYASENA, LASANTHA, CHANDANA;  
EHLERT, ZOE;  
CHANNABASAVARADHYA, CHANDRA  
SHEKARA, A. y  
GUPTA, MANJU**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 660 976 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 determina la cigosidad del gen *fad3* en canola

Esta solicitud se refiere a un método para determinar la cigosidad de una planta de canola que comprende un gen *fad-3c*, en el que se usan cebadores y sondas específicos en un ensayo de PCR TaqMan®.

5 **Antecedentes de la descripción**

El género *Brassica* incluye canola, uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo y un importante cultivo oleaginoso que crece en zonas templadas. La canola se ha caracterizado tradicionalmente como *Brassica napus* L. (una especie obtenida como resultado de cruces inter-específicos entre *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*) en la que el ácido erúxico y los glucosinolatos se han eliminado o reducido significativamente por reproducción convencional. La mayoría del aceite de canola se encuentra en forma de aceites vegetales producidos para el consumo humano. También hay un mercado creciente para el uso de aceite de canola en aplicaciones industriales.

El género *Brassica* está compuesto por tres especies diploides, cada una de las cuales posee un genoma único que se denomina el genoma A, el genoma B o el genoma C. Las plantas *Brassica rapa* poseen un genoma A diploide. Las plantas *Brassica nigra* poseen un genoma B diploide. Las plantas *Brassica oleracea* poseen un genoma C diploide. Los híbridos de estas especies se pueden producir por cruzamiento 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 A diploide. La investigación citogenética reveló que los genomas AA y CC muestran un grado de parentesco, siendo parcialmente homólogos entre sí, y se cree que proceden de un genoma ancestro común (Prakash and Hinata, 1980). Aunque clasificados técnicamente 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 AA de *Brassica rapa* contribuía con diez cromosomas a *Brassica napus*, mientras que *Brassica oleracea* contribuía con nueve cromosomas de su genoma CC como donante materno (Song et al., 1992).

La calidad del aceite comestible e industrial procedente de una variedad particular de semilla de canola está determinada por sus ácidos grasos constituyentes, puesto que el tipo y la cantidad de insaturación de los ácidos grasos tienen implicaciones tanto para aplicaciones dietéticas como 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, puesto que el aceite se oxida fácilmente, viéndose afectado el índice de oxidación por diversos factores, que incluyen la presencia de oxígeno, la exposición a la luz y al calor y la presencia en el aceite de antioxidantes y pro-oxidantes naturales o añadidos. La oxidación provoca sabores desagradables y ranciedad como resultado de frituras repetidas (oxidación inducida) o almacenamiento durante un período prolongado (auto-oxidación). La oxidación también puede alterar las propiedades lubricantes y viscosas del aceite de canola.

Los perfiles de aceite de canola que presentan niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados y niveles elevados de ácido oleico monoinsaturado con relación al aceite de canola convencional están asociados a una mayor estabilidad oxidante. La susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos individuales depende de su grado de insaturación. Por tanto, el índice de oxidación del ácido linolénico, que posee tres dobles enlaces carbono-carbono, es 25 veces mayor que el del ácido oleico, que solo tiene un doble enlace carbono-carbono, y 2 veces el del ácido linoleico, que tiene dos dobles enlaces carbonos-carbono. Los ácidos linoleico y linolénico tienen también el mayor impacto sobre el sabor y el olor porque forman fácilmente hidroperóxidos. Con alto contenido de ácido oleico (mayor o igual al 70% de ácido oleico) es menos susceptible a la oxidación durante el almacenamiento, fritura y refinado, y se puede calentar a una temperatura más alta sin humear, que lo hace más adecuado como aceite de cocina.

La calidad del aceite de canola está determinada por sus ácidos grasos constituyentes, tales como ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). La mayoría de las variedades cultivadas de canola producen normalmente aceite con aproximadamente 55-65% de ácido oleico y 8-12% de ácido linolénico. Altas concentraciones de ácido linolénico conducen a inestabilidad del aceite y a un sabor desagradable, mientras que altos niveles de ácido oleico aumentan la estabilidad oxidante y el valor nutricional del aceite. Por tanto, el desarrollo de las variedades cultivadas de canola con ácido oleico aumentado y ácido linolénico reducido es altamente deseable para la calidad del aceite de canola.

Se identificaron dos *loci* y su localización genómica cartografiada a partir de una variedad cultivada de canola que posee cantidades aumentadas de ácido oleico y cantidades reducidas de ácido linolénico. Un *locus* tiene un efecto principal y el segundo *locus* tiene un efecto secundario sobre la producción aumentada de ácido oleico y reducida de ácido linoleico. Se determinó que el *locus* principal para alto contenido de ácido oleico (C18:1) es el gen ácido graso-desaturasa-2 (*fad-2*) y está localizado en el grupo de ligamiento, N5. El segundo *locus* está localizado en el grupo de ligamiento N1. Un *locus* de rasgos cuantitativos (QTL) para el ácido linolénico (C18:3) es el gen ácido graso-desaturasa-3 del genoma C (*fad-3c*) y está localizado en el grupo de ligamiento N14. El segundo QTL principal reside en el grupo de ligamiento N4 y es el gen ácido graso-desaturasa-3 del genoma A (*fad-3a*). Las secuencias

genómicas de los genes *fad-2* y *fad-3c* se amplificaron y secuenciaron a partir tanto de un mutante inducido por metanosulfonato de etilo (EMS) y una variedad cultivada de canola de tipo natural. Una comparación de las secuencias de alelos mutantes y de tipo natural de los genes *fad-2* y *fad-3c* reveló polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes de las plantas mutadas por EMS. Basándose en las diferencias de secuencias entre los alelos mutantes y de tipo natural, se desarrollaron dos marcadores de SNP, correspondientes a las mutaciones de los genes *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 las semillas. En general, estos métodos requieren líneas estables de reproducción parentales casi homocigóticas, autoincompatibles e incompatible familiarmente, en el que las líneas de reproducción parentales están disponibles solo después de la autopolinización repetida para generar líneas endogámicas. Además, la endogamia para desarrollar y mantener las líneas parentales se logra por técnicas de trabajo intensivo, tales como polinización de los capullos, puesto que los sistemas de producción de semillas híbridas de *Brassica* basados en rasgos auto-incompatibles deben utilizar plantas fuertemente auto-incompatibles. Las condiciones ambientales durante el proceso de reproducción, tales como la temperatura y la humedad, afectan generalmente al metabolismo lipídico de las plantas, afectando también por tanto al nivel del contenido de ácidos grasos (Harwood, 1999). Por tanto, la variabilidad ambiental hace que sea menos fiable la selección fenotípica de las plantas. Deng and Scarth (1998) encontraron que el aumento en la temperatura posterior a la floración redujo significativamente los niveles de C18:3 y aumentó los de C18:1. Resultados similares se recogieron en otros estudios (Yermanos and Goodin, 1965; Canvin, 1965).

La reproducción para variedades de bajo contenido de ácido linolénico está particularmente cuestionada puesto que el contenido de C18:3 es un rasgo multigénico y se hereda de manera recesiva con una heredabilidad relativamente baja. El análisis genético de una población procedente del cruzamiento 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 de C18:3 bajo era controlado por dos *loci* principales con efectos aditivos designados 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 *fad-3* (ácidos grasos-desaturasa-3); uno localizado en el genoma A (que procede de *Brassica rapa*) y el otro en el genoma C (que procede de *Brassica oleracea*) (Jourden et al., 1996; Barret et al., 1999).

Los rasgos que varían continuamente debido a las influencias genéticas (aditiva, dominancia y epistática) y medioambientales se denominan comúnmente "rasgos cuantitativos". Los rasgos cuantitativos se pueden distinguir de los rasgos "cualitativos" o "discretos" basándose en dos factores: influencias medioambientales en la expresión génica que producen una distribución continua de fenotipos; y el patrón de segregación complejo producido por herencia multigénica. La identificación de una o más regiones del genoma asociadas a la expresión de un rasgo cuantitativo condujo al descubrimiento de *loci* de rasgos cuantitativos ("QTL"). Thormann et al. (1996) cartografiaron dos QTL que explicaban el 60% de la varianza para el contenido linolénico, mientras que Somers et al. (1998) identificaron tres QTL que explicaban colectivamente el 51% de la variación fenotípica del contenido de C18:3. Chen and Beversdorf (1990) informaron también sobre un modelo aditivo de tres *loci*. Rucker and Robbelen (1996) indicaron que en la etapa de desaturación están más probablemente implicados varios genes menores.

Se estimó que la heredabilidad para el contenido de C18:3 era del 26-59% (Kondra and Thomas, 1975) (donde la variabilidad de la heredabilidad es una función de la genética en oposición a los factores medioambientales). 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 al alargamiento de C16:3 (Thompson, 1983).

En contraste con el ácido linolénico, la herencia del ácido oleico es menos compleja y la heredabilidad del ácido oleico es relativamente alta. Está documentado que el alto contenido de ácido oleico está controlado por un *locus* principal llamado gen *fad-2* (ácidos grasos-desaturasa-2) que codifica la enzima responsable de la desaturación del ácido oleico a ácido linoleico (C18:2) (Tanhuanpaa et al., 1998; Schierholt et al., 2001). Todas las copias génicas funcionales del gen *fad-2* que han sido documentadas y cartografiadas hasta la fecha están localizadas en el grupo de ligamiento N5 originado en el genoma A (Scheffler et al., 1997; Schierholt et al., 2000). Chen and Beversdorf (1990) documentaron que la acumulación de ácido oleico estaba controlada por dos sistemas genéticos de segregación, uno que actúa sobre el alargamiento de la cadena y el otro que implica la desaturación. Se estimó que la heredabilidad del contenido de C18:1 era del 53% al 78% (Kondra and Thomas 1975) y 94% (Schierholt and Becker, 1999), respectivamente. Debido a la mayor heredabilidad, la expresión del contenido de C18:1 está menos afectada medioambientalmente y es relativamente estable (Schierholt and Becker, 1999).

En el germoplasma de canola Nexera™, se encuentra que 1 a 2 genes controlan el contenido de C18:1 y 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 en la semilla es continua, lo que dificulta la identificación de las clases genotípicas con niveles de C18:3 deseables. Además, existe una baja correlación en el contenido de ácidos grasos entre las plantas cultivadas en invernadero (GH) y en el campo, haciendo aún más cuestionable la selección fiable de 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 DNA insertada y su adyacente de DNA genómico. El oligonucleótido se hibrida a un producto de PCR monocatenario (un “amplicón”) de la región de interés (es decir, un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una DNA-polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina-5'-fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación da como resultado una señal de luz que se mide. Una señal de luz indica la presencia de la secuencia insertada transgénica/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 por fluorescencia es otro método que se puede usar para detectar un amplicón. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido para solapar la unión del DNA insertado y del DNA flanqueante genómico. El oligonucleótido se hibrida con el producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el DNA insertado y otro en la secuencia del DNA genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una DNA-polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. El alargamiento 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 insertada/flanqueante transgénica debido a la amplificación, hibridación y alargamiento de una sola base con éxito.

Se han descrito balizas moleculares para usar en la detección de secuencias. Brevemente, las balizas moleculares comprenden una sonda oligonucleotídica para la FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que se puede diseñar de tal modo que la sonda para la FRET solape la unión del DNA insertado y el DNA genómico flanqueante. La estructura única de la sonda para la FRET da como resultado que contenga una estructura secundaria que mantiene muy próximos los restos fluorescentes y desactivantes. La sonda para la FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de DNA insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTP. Después de la amplificación con éxito por PCR, la hibridación de la sonda para la 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 desactivantes. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/insertada transgénica debido a la amplificación e hibridación con éxito.

Los ensayos con sondas 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 DNA. Brevemente, la PCR TaqMan® utiliza una sonda oligonucleotídica para la 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 de un episodio. La sonda para la FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de DNA insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y de los dNTP. La hibridación de la sonda para la FRET y la posterior digestión durante la etapa de amplificación de PCR debido a la actividad de 5'-exonucleasa de la polimerasa Taq, da como resultado la escisión y la liberación del resto fluorescente del resto desactivante en la sonda para la FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia insertada flanqueante/transgénica debido a la hibridación y amplificación con éxito.

Los marcadores moleculares también son útiles para la identificación específica de secuencias de DNA. La selección del marcador molecular se basa en los genotipos y por tanto es independiente de los efectos medioambientales. Los marcadores moleculares ayudan a aliviar el problema de la selección no fiable 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 unidos a los genes que controlan el contenido de C18:1 y C18:3 pueden facilitar la selección temprana de plantas portadoras de genes con alto contenido de C18:1 y bajo contenido de C18:3. La selección asistida por marcadores en una etapa temprana puede ayudar a ahorrar espacio en el invernadero, mejorar la eficacia del uso del invernadero y reducir la carga de trabajo de reproducción en el campo.

Más generalmente, los marcadores moleculares tienen ventajas sobre los marcadores morfológicos porque: 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 presentan una relación 1:1 entre el genotipo y el fenotipo (permitiendo así la puntuación inequívoca de todos los genotipos posibles en 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.

Se han identificado diferentes tipos de marcadores moleculares, tales como marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) (Tanhuanpaa et al., 1995; Hu et al., 1995; Rajcan et al., 1999; Jourden et al., 1996), marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción) (Thormann et al., 1996) y marcadores SCAR (región amplificada caracterizada por secuencias) (Hu et al., 1999) que están 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 un marcador RAPD que estaba relacionado con la concentración de ácido oleico que afectaba a los QTL en el nabo de primavera (*B. rapa ssp. oleifera*) y más tarde se convirtió en un marcador SCAR (Tanhuanpaa et al.,

1996). Schierholt et al. (2000) identificaron tres marcadores AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmento amplificado) vinculados a una mutación con alto contenido de ácido oleico en colza oleaginosa de invierno (*B. napus* L.). Tanhuanpaa et al. (1998) desarrollaron un marcador de PCR específico de alelos para el ácido oleico comparando el alelo de tipo natural y el de alto contenido de ácido oleico del *locus* del gen *fad-2* en el nabo 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 la selección a gran escala mediante automatización.

#### Breve resumen de la descripción

La presente descripción se refiere a ensayos de PCR TaqMan® de punto final para la detección y análisis de la cigosidad con alto rendimiento, del gen *fad-3c* en canola, como se define en las reivindicaciones. La presente descripción se refiere además, en parte, al uso del gen *fad-3c* de tipo natural en canola como referencia para uso en la determinación de la cigosidad. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden usar para identificar únicamente la cigosidad y 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 (por ejemplo, de canola).

Por tanto, una realización de la presente descripción se refiere a PCR TaqMan®, un método flexible para el análisis con alto rendimiento de la cigosidad y reproducción. La utilización de la aplicación de PCR TaqMan® de punto final presentada en la presente descripción proporciona una aplicación fiable, precisa y con alto rendimiento para la cigosidad de *fad-3c* y el análisis de la reproducción de la canola. De acuerdo con la invención, en dicho método de análisis se usan cebadores y sondas específicos.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una sección de la secuencia del gen *fad-3c* (SEQ ID NO: 1) que ilustra la posición de la mutación en *fad-3c* identificada por Hu et al., (2006) (flecha). El intrón 6 está en texto de color más claro y un segundo polimorfismo está indicado con un asterisco.

La Figura 2 es un ejemplo de los resultados del análisis de la cigosidad (de canola), que muestran tres genotipos de *fad-3c* después de un ensayo TaqMan® de punto final (resultados generados utilizando el programa informático SDS 2.4 disponible en 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-3* que ilustra la posición de la mutación de *fad-3c*.

La SEQ ID NO:2 proporciona el cebador delantero D-CL-FAD3C-F (que se une a la secuencia genómica flanqueante).

La SEQ ID NO:3 proporciona el cebador inverso D-CL-FAD3C-R2 (que se une a la secuencia de inserción).

La SEQ ID NO:4 proporciona la sonda D-CL-FAD3C-FAM para la unión preferencial del gen *fad-3c* mutado que tiene un polimorfismo de un solo nucleótido de G a.

La SEQ ID NO:5 proporciona la sonda D-CL-FAD3C-VIC para la detección del gen *fad-3c* de tipo natural.

#### Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere en parte a los ensayos de PCR TaqMan® de punto final para la detección y el análisis con alto rendimiento de la cigosidad del gen *fad-3c* en canola, como se define en las reivindicaciones. La presente descripción se refiere, en parte, al uso del gen *fad-3c* de tipo natural en canola como referencia para uso en la determinación de la cigosidad. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden usar para identificar exclusivamente la cigosidad y variedad de líneas de canola que comprenden el gen objeto. De acuerdo con la invención, en dicho método de análisis se usan cebadores y sondas específicos. La presente descripción proporciona también kits relacionados para determinar la cigosidad y variedad de una muestra (por ejemplo, de canola). Por tanto, una realización de la presente descripción se refiere a PCR TaqMan®, un método flexible para análisis con alto rendimiento de la cigosidad y reproducción. La utilización de la aplicación de PCR TaqMan® de punto final con los cebadores y las sondas presentados en esta descripción proporciona una aplicación fiable, precisa y con alto rendimiento para el análisis de la cigosidad de *fad-3c* y la reproducción 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 de *fad-3c* descrito por Hu et al., (2006). El ensayo utiliza dos regiones de cebadores y dos sondas MGB para detectar los alelos de *fad-3c* de tipo natural y mutante (véase la Tabla 1). Los cebadores y sondas para TaqMan® para detectar esta mutación del SNP fueron diseñados en parte por el programa informático *Primer express* (Applied Biosystems, Austin, Tx) usando las secuencias del gen *fad-3c*. Este nuevo ensayo TaqMan® de *fad-3c* se validó usando DNA extraído de plantas de canola que eran homocigóticas, hemicigóticas y

de tipo natural (sin mutación) para el gen *fad-3c*. El ensayo TaqMan® de *fad-3c* también se optimizó en cuanto a su rendimiento en parte con el sistema de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems en los formatos de 96 o 384 pocillos, utilizando las condiciones rápidas de ciclo térmico de PCR.

**Tabla 1.** Secuencias de los cebadores y las sondas utilizados en el ensayo de TaqMan® de *fad-3c*

SEQ ID NO:	Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')
SEQ ID NO:2	D-CL-FAD3c-F	Cebador delantero	ACGATGATAAGCTGCCTTGGT
SEQ ID NO:3	D-CL-FAD3c-R	Cebador inverso	TCAACAGTTGTTAATCCTCCACGT
SEQ ID NO:4	D-CL-FAD3c-FAM	Sonda para detectar <i>fad-3c</i> mutante	6FAM-CAGAGGCAAGATAAGT-MGB
SEQ ID NO:5	D-CL-FAD3c-VIC	Sonda para detectar <i>fad-3c</i> de tipo natural	VIC-ACAGAGGCAAGGTAAGT-MGB

5

En el ensayo se usaron muestras de hojas NEX828 y Quantum. El DNA de las poblaciones reproductoras de canola se usó para validar este ensayo.

Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para diseñar y/o producir moléculas de ácidos nucleicos para diagnóstico ilustradas y/o sugeridas en la presente memoria. Se diseñaron cebadores y sondas específicos para TaqMan®, como se detalla en la presente memoria, en parte de acuerdo con las secuencias de DNA localizadas aguas arriba o aguas abajo, o en su proximidad, de los SNP específicos identificados en la presente memoria en el gen *fad-3c*.

10

Por 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 los SNP identificados en la presente memoria, con el fin de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene los SNP de interés, y la cigosidad de la progenie. Además, se incluyen métodos para detectar la cigosidad y son útiles, por ejemplo, para cumplir con las reglamentaciones que requieren la aprobación previa a su comercialización y etiquetado de alimentos procedentes de plantas de cultivos recombinantes.

15

La presente descripción se refiere en parte a un ensayo de PCR TaqMan® de punto final basado en fluorescencia que utiliza el gen *fad-3c* no mutante endógeno como control para el análisis con alto rendimiento de la cigosidad de plantas de canola.

20

La presente descripción se refiere también en parte al desarrollo de una PCR TaqMan® de punto final dúplex para el análisis de la cigosidad de la canola. Además, la presente descripción se relaciona en parte con el desarrollo de kits para ensayos de la reproducción de los genes *fad-3c* de la canola.

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 analizado y un "menos" significa que la muestra es negativa para el gen analizado. Estos ensayos utilizan típicamente un conjunto de cebadores oligonucleotídicos y dos sondas oligonucleotídicas, una sonda que se hibrida preferentemente con los SNP de *fad-3c* mutado y la otra sonda que se hibrida preferentemente con la secuencia de *fad-3c* de tipo natural, respectivamente.

25

Las ventajas asociadas con la presente descripción incluyen su menor dependencia de la calidad y cantidad del DNA. Además, la presente descripción no requiere una etapa larga de desnaturalización inicial que, si no se maneja adecuadamente, puede hacer con frecuencia que otros ensayos de detección de SNP no tengan éxito. Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para analizar eficazmente grandes cantidades de muestras de canola de una manera con alto rendimiento dentro de un entorno comercial. Otra ventaja de la presente descripción es el ahorro de tiempo. El presente análisis TaqMan® de punto final para el análisis de la cigosidad y reproducción de canola ofrece ventajas sobre otros formatos de aplicación, particularmente cuando se analizan grandes cantidades de muestras.

30

35

Esta descripción se refiere en parte al análisis de la reproducción de plantas. Esta descripción incluye nuevos métodos de detección de los SNP en plantas de canola que afectan a los niveles de ácido oleico y linolénico en las plantas objeto.

40

Además, puede ser posible detectar la presencia de los SNP objeto por otros métodos conocidos de detección de ácidos nucleicos, tales como PCR o hibridación de DNA usando las sondas de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria. Los ensayos de PCR específicos de episodios se estudian en la presente memoria. (Véase también Windels et al., (*Med. Fac. Landbouww*, Univ. Gent 64/5b:459-462, 1999).

Como se usa en la presente memoria, el término “progenie” significa la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora.

5 Las técnicas de detección de la presente descripción son especialmente útiles junto con la reproducción de plantas, por ejemplo, para determinar la cigosidad de las plantas de la progenie después de que una planta progenitora que comprende un SNP de interés se cruza con otra planta. La aplicación y métodos presentes benefician los programas de reproducción de canola, así como los procesos de control de calidad. Los kits de detección por PCR para líneas de canola, usando los métodos y ensayos descritos en la presente memoria, se pueden fabricar y usar ahora. Además, la presente descripción puede beneficiar el registro del producto y la administración del producto.

10 Una planta de canola que comprende la composición genética *fad-3c* deseada se puede reproducir primero cruzando sexualmente una primera planta de canola progenitora, que consiste en una planta de canola cultivada a partir de semillas de una cualquiera de las líneas mencionadas en la presente memoria, y una segunda planta de canola progenitora, produciendo con ello una pluralidad de plantas de la primera progenie; y luego seleccionando una planta de la primera progenie que posea los genes *fad-3c* deseados como se describe en la presente descripción; y autopolinizando la planta de la primera progenie, produciendo de este modo una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y luego seleccionando de las plantas de la segunda progenie una planta que posea los genes *fad-3c* deseados de acuerdo con la presente descripción. Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie o de la planta de la segunda progenie con la planta de canola del segundo progenitor o una planta de canola del tercer progenitor. A continuación, se puede sembrar una cosecha de canola que comprende semillas de canola de la presente descripción, o de su progenie.

20 Esta descripción incluye además procesos de realización de cruzamientos usando una planta de canola que comprenda la composición genética *fad-3c* deseada como al menos un progenitor. Por ejemplo, la presente descripción incluye una planta híbrida F1 que tiene como uno o ambos progenitores cualquiera de la planta de canola que comprenda la composición genética *fad-3c* deseada. También en la presente descripción se incluye la semilla producida por dichos híbridos F1. Esta descripción incluye un método para identificar una semilla híbrida F1 cruzando una planta ilustrativa con una planta diferente (por ejemplo, progenitora endogámica) y recolectando y analizando la semilla híbrida resultante, usando el método de la presente descripción. Las plantas de canola que se usan para producir el híbrido F1 pueden ser un progenitor femenino o un progenitor masculino.

30 También debe entenderse que las plantas transgénicas se pueden producir para que contengan los genes *fad-3c* descritos en la presente invención. Adicionalmente, las plantas transgénicas que comprenden las características del gen *fad-3c* descritas en la presente memoria se pueden cruzar con una planta que comprenda una composición genética diferente, produciendo así una descendencia que contiene genes exógenos que se segregan independientemente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para los genes exógenos añadidos. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta progenitora y el cruzamiento externo con una planta no transgénica, como la propagación vegetativa. Se conocen en la técnica otros métodos de reproducción comúnmente usados para diferentes rasgos y cultivos. Se ha utilizado la reproducción de retrocruzamiento para transferir genes con un rasgo altamente heredable y simplemente sometido a introgresión y en una variedad cultivada homocigótica deseable o línea endogámica, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo a transferir se denomina progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad cultivada) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante. Después del cruzamiento inicial, se seleccionan los individuos que posean el fenotipo del progenitor donante y se cruzan repetidamente (retrocruzan) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad cultivada) 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 y con alto rendimiento para detectar el transgén *fad-3c* en plantas de la progenie y para determinar el nivel de cigosidad de las plantas de la progenie.

45 Los métodos de la presente descripción, por ejemplo, los cebadores y las sondas oligonucleotídicos, se pueden usar para métodos de reproducción asistida por marcadores (MAB). Los métodos de la presente descripción, por ejemplo los cebadores y las sondas oligonucleotídicos, se pueden usar con ensayos relacionados (ensayos de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), ensayos de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ensayos del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)) que identifiquen rasgos agrónomicamente útiles y unidos genéticamente por la detección de los SNP o repeticiones de secuencias simples (SSR), usando protocolos disponibles públicamente que son conocidos en la técnica. Los SNP descritos en la presente memoria pueden ser rastreados en la progenie de un cruzamiento con una planta de canola de la presente descripción (o su progenie y cualquier otra variedad cultivada o variedad de canola) usando los métodos de MAB. Las moléculas de DNA se pueden usar como marcadores para este rasgo y los métodos de MAB, que son muy conocidos en la técnica, se pueden usar para rastrear los SNP en plantas de canola en las que al menos una planta de canola de la presente descripción, o su progenie, fuera un progenitor o antepasado. Los métodos de la presente descripción se pueden usar para identificar cualquier variedad de canola que tenga los SNP objeto descritos en la presente memoria.

60 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, comprendiendo dicho método la reproducción con

una planta de la presente descripción. Más específicamente, dichos métodos pueden comprender el cruzamiento de dos plantas de la presente descripción, o una planta de la presente descripción y cualquier otra planta. Los métodos ilustrativos pueden comprender además seleccionar la progenie de dicho cruzamiento analizando dicha progenie para determinar un SNP de la presente descripción, detectable de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, la presente descripción se puede usar para rastrear la cigosidad de plantas de canola mediante ciclos de reproducción con plantas que comprenden otros rasgos deseables, tales como rasgos agronómicos como los analizados en la presente memoria en los diversos ejemplos. Las plantas que comprenden los SNP objeto y los rasgos deseados también se pueden, por ejemplo, detectar, identificar, seleccionar y usar rápidamente en más series de reproducción. Los SNP/rasgos objeto se pueden también combinar mediante reproducción y rastreo de acuerdo con la presente descripción, con otros rasgos, por ejemplo, posible(s) rasgo(s) de resistencia(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 objeto combinados con un gen que codifica la resistencia a un herbicida, tal como glifosato.

La presente descripción incluye secuencias de DNA que comprenden un fragmento contiguo útil como secuencias cebadoras para la producción de un producto de amplicón para diagnosticar una o más de las plantas de canola con *fad-3c*.

Las realizaciones relacionadas pertenecen a secuencias de DNA 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 DNA identificadas en la presente memoria, o sus complementos. Dichas secuencias pueden ser útiles como cebadores de DNA en métodos de amplificación de DNA. Los amplicones producidos usando estos cebadores pueden ser usados como diagnósticos para cualquier combinación y cigosidad de las variedades de canola con *fad-3c* citadas en la presente memoria. Por tanto, la descripción incluye también los amplicones producidos por dichos cebadores de DNA y cebadores homólogos.

Incluso en otras realizaciones, la presente descripción incluye métodos para producir los SNP de *fad-3c* de la presente descripción, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea de canola progenitora que comprende uno de los SNP descritos en la presente memoria y que confiere uno de los rasgos del ácido oleico y/o linolénico descritas en la presente memoria, 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 la progenie usando marcadores moleculares. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retrocruzar la planta de la progenie con la segunda línea de canola progenitora para producir una planta de canola homocigótica o de reproducción verdadera que comprenda dichos rasgos de *fad-3c*.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruzamiento con dichas plantas de canola con *fad-3c*. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende DNA de canola, con un conjunto de cebadores de la presente descripción. Dichos cebadores, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con DNA genómico de al menos una de dichas plantas de canola con *fad-3c*, producen un primer amplicón que sirve como diagnóstico para al menos uno de dichos SNP de canola o genes de tipo natural. Dichos métodos comprenden además realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el primer amplicón y detectando el primer amplicón con sondas específicas para los SNP de *fad-3c* descritas en la presente memoria 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 reasociadas con ellos, y comparar la fluorescencia relativa de las sondas usadas en la aplicación de fusión de discriminación alélica. 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 homocigótica para el SNP.

Los kits de detección de DNA se pueden desarrollar usando las composiciones descritas en la presente memoria, junto con métodos muy conocidos en la técnica de detección de DNA. Los kits son útiles para la identificación de los SNP objeto de canola en una muestra y se pueden aplicar a métodos para la reproducción de plantas de canola que contengan este DNA. Los kits contienen secuencias de DNA homólogas o complementarias a los amplicones, por ejemplo, descritos en la presente memoria. Estas secuencias de DNA se pueden usar en reacciones de amplificación del DNA o como sondas en un método de hibridación del DNA. Los kits pueden contener también los reactivos y materiales necesarios para la realización del método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácidos nucleicos aislada a la que está unida una etiqueta detectable convencional o una molécula indicadora (tal como un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima). Dicha sonda es complementaria con una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente descripción, con una cadena de DNA genómico de una de dichas plantas de canola que comprende genes *fad-3c* de interés, ya sea procedente de una planta de canola o de una muestra que incluye DNA del episodio. Las sondas de acuerdo con 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 DNA diana y se pueden usar para detectar la presencia de dicha secuencia de DNA diana.

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

pueden añadir otras moléculas a la sonda oligonucleotídica, tal como una molécula desactivadora. La adición de estas moléculas a una sonda oligonucleotídica no altera la función de la sonda oligonucleotídica cuando se hibrida con DNA monocatenario y produce una nueva cadena de DNA mediante un proceso de amplificación.

5 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 por el fluoróforo de una señal fluorescente que puede ser desactivado por un desactivador localizado muy próximo al fluoróforo. Cuando el desactivador está separado del fluoróforo, la señal fluorescente ya no se desactiva y la acumulación de la señal fluorescente, que está directamente correlacionada con la cantidad de DNA diana, se puede detectar en tiempo real con un fluorómetro automático. Los fluoróforos se pueden usar en combinación, en la que los espectros de excitación y emisión son  
10 significativamente diferentes puesto que permite 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 Cy 3, 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 uso con el método que consiste en un sistema de detección por un ensayo homogéneo para un  
15 proceso de PCR que usa FRET de la presente invención incluye un colorante fluorescente FAM o un colorante fluorescente JOE.

Se han desarrollado desactivadores para desactivar fluoróforos a una longitud de onda específica y son conocidos en la técnica. Cuando el desactivador está localizado en estrecha aproximación al fluoróforo, el fluoróforo transfiere  
20 energía al desactivador. El desactivador transfiere esta energía y vuelve a un estado básico natural mediante extinción de la emisión o no radiactivamente. En la extinción no radiactiva u oscura, la energía transferida desde el fluoróforo se emite como vibraciones moleculares. La selección de un desactivador considera cualidades, tales como baja fluorescencia de fondo, alta sensibilidad y solapamiento espectral máximo, para proporcionar un desactivador que pueda permitir un uso más amplio de fluoróforos. Algunas realizaciones preferidas de desactivadores incluyen:  
25 desactivadores Dabcyl, desactivadores Tamra, desactivadores Qxl, desactivador Iowa black FQ, desactivador Iowa black RQ o un desactivador IR Dye QC-1. Una realización especialmente preferida de un desactivador incluiría un desactivador Blackhole marcado en un cebador oligonucleotídico que está diseñado antisentido para el oligonucleótido marcado con FAM.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados/sintetizados que se reasocian con una cadena de DNA diana complementaria por hibridación de ácidos nucleicos, formando así un híbrido entre el cebador y la cadena de DNA  
30 diana y luego son prolongados a lo largo de la cadena de DNA diana por una polimerasa, por ejemplo, una DNA-polimerasa. Los pares de cebadores de la presente descripción se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y los cebadores son generalmente polinucleótidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,  
35 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,  
40 132, 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,  
45 224, 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,  
50 316, 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,  
55 385, 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 o  
500 nucleótidos o mayores. Dichas 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 secuencias completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana y que retienen la capacidad de hibridarse con las secuencias diana se pueden diseñar por métodos convencionales.

60 Métodos para preparar y usar sondas y cebadores están descritos, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los pares de cebadores para PCR pueden proceder de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas

informáticos destinados a dicho fin.

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

5 Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos de la presente descripción se hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de DNA diana. En general, se puede usar cualquier método convencional de hibridación o  
 10 amplificación de ácidos nucleicos para identificar la presencia de DNA de una muestra de *fad-3c*. Las moléculas de ácidos nucleicos o sus fragmentos son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos en ciertas circunstancias. Como se usa en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácidos  
 15 nucleicos son capaces de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácidos nucleicos bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácidos nucleicos es el "complemento" de otra molécula de ácidos nucleicos si presentan total complementariedad. Como se usa en la presente memoria, se dice que las moléculas presentan "total complementariedad" cuando cada nucleótido de una  
 20 de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en condiciones convencionales de "baja rigurosidad". Similarmente, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones convencionales de rigurosidad están descritas por Sambrook et al., 1989. Por tanto, se permiten desviaciones de la total complementariedad, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura bicatenaria. Con el fin de que una molécula de ácidos nucleicos sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencias para poder formar una estructura bicatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleados.

25 Como se usa en la presente memoria, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácidos nucleicos con la que está siendo comparada en condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas" se define funcionalmente respecto a la hibridación de una sonda de ácidos nucleicos con un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia particular de ácidos nucleicos de interés) por el procedimiento de hibridación específico descrito por 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. Por consiguiente, las  
 30 secuencias de nucleótidos de la descripción se pueden usar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de DNA.

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, se emplearán típicamente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán  
 35 condiciones de sal relativamente baja y/o temperatura alta, tales como las proporcionadas por  $MgCl_2$  de aproximadamente 0,50 mM a aproximadamente 02,00 mM a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 75°C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar, o bien la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras se cambia la otra variable. Dichas condiciones selectivas toleran poco, si es que lo toleran, el desapareamiento entre la sonda y el molde o cadena diana. La detección de secuencias de DNA mediante hibridación es muy conocida por los expertos en la técnica, y las enseñanzas de las patentes de EE.UU. N° 4.965.188 y 5.176.995 son ilustrativas de los métodos de análisis por hibridación.

40 En una realización ilustrativa, un ácido nucleico de la presente descripción se hibridará específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ilustrados o sugeridos en la presente memoria, incluyendo complementos y sus fragmentos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente descripción, una molécula de ácidos nucleicos marcadora de la presente descripción tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se describe en la presente memoria en una de las secuencias ilustradas, o sus complementos y/o fragmentos.

45 En otro aspecto de la presente descripción, una molécula de ácidos nucleicos marcadora de la presente descripción comparte una identidad de secuencias con dichas secuencias de ácidos nucleicos entre 80% y 100% o 90% y 100%. En un aspecto adicional de la presente descripción, una molécula de ácidos nucleicos marcadora de la presente descripción comparte una identidad de secuencias con dicha secuencia entre 95%, 96%, 97%, 98% y/o 99% y 100%. Dichas secuencias se pueden usar como marcadores en métodos de reproducción de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de DNA diana puede ser detectada por cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica, estos pueden incluir, aunque sin limitación, etiquetas fluorescentes, etiquetas radiactivas, etiquetas basadas en anticuerpos y etiquetas quimioluminiscentes.

55 Con relación a la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, por PCR) usando un par particular de cebadores de amplificación, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permitan que el par de cebadores se hibride principalmente con sus secuencias de ácidos nucleicos diana, y con alta preferencia por ellas, 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 rigurosas de hibridación, principalmente con la secuencia de ácidos nucleicos, y con una alta preferencia por ella, en una muestra que comprende la secuencia diana.

5 Como se usa en la presente memoria, “DNA amplificado” o “amplicón” se refiere al producto de la amplificación de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos diana que es parte de un molde de ácidos nucleicos. Por ejemplo, para determinar si la planta de canola que resulta de un cruzamiento sexual contiene un SNP de interés como se describe en la presente memoria, se puede someter DNA extraído de una muestra de tejido de planta de canola a un método de amplificación de ácidos nucleicos usando un par de cebadores que incluye un cebador procedente de una secuencia aguas arriba o aguas abajo en el genoma de la planta de canola adyacente al sitio del SNP y un segundo cebador procedente del otro extremo de la secuencia aguas arriba o aguas abajo en el genoma de la planta de canola adyacente al sitio del SNP, produciendo con ello un amplicón que sirve para diagnóstico de la presencia del SNP. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que sirve también para diagnóstico para el gen de tipo natural o mutado. El amplicón puede tener una longitud que varíe desde 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 o 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 o más pares de bases de nucleótidos (más o menos cualquiera de los incrementos antes citados). Un miembro de un par de cebadores procedente de la secuencia genómica de la planta puede estar localizado a una distancia de la secuencia del 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 cebadores que se puedan formar en la reacción de amplificación térmica del DNA.

La amplificación de ácidos nucleicos se puede realizar pro cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la PCR. Se conoce en la técnica una variedad de métodos de amplificación y están descritos, entre otras, en la patente de EE.UU. N° 4.683.195 y la patente de EE.UU. N° 4.683.202. Los métodos de amplificación por PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb del DNA genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de DNA, se pueden usar en la práctica de la presente descripción. La secuencia de un SNP de *fad-3c* se puede verificar amplificando dichas secuencias usando cebadores procedentes de las secuencias proporcionadas en la presente memoria seguido de la secuenciación de DNA estándar del amplicón de PCR o del DNA clonado.

El amplicón producido por estos métodos se puede detectar por una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio es un método común muy conocido para detectar amplicones de DNA. Otro de dichos métodos es el *Genetic Bit Analysis* en el que se diseña un oligonucleótido de DNA que se solapa tanto a la secuencia del DNA genómico flanqueante adyacente como a la secuencia del DNA 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 otro en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto monocatenario de la PCR se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una sola base usando una DNA-polimerasa y los ddNTP marcados específicos para la próxima base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia de inserción/flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión de una sola base con éxito.

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

Después de amplificación, se puede realizar un análisis de discriminación alélica (usando la sonda de hidrólisis TaqMan® descrita anteriormente), para determinar la presencia de un SNP de interés y la cigosidad de la muestra. Durante el análisis de discriminación alélica, se hibridan al amplicón dos sondas de hibridación diferentes (una sonda que incluye un nucleótido complementario con la secuencia de SNP y la otra sonda que tiene un nucleótido complementario con la secuencia de tipo natural) y se digieren, liberando así los restos desactivadores de la sonda debido a la actividad de exonucleasa en 5' de la polimerasa Taq y que da como resultado 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 llevar a la práctica la descripción y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la descripción. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan métodos específicos utilizados para ilustrar modos preferidos para su práctica.

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 salvo indicación contraria.

A menos que se indique lo contrario se usan las siguientes abreviaturas.

	pb	pares de bases
	°C	grados Celsius
	DNA	ácido desoxirribonucleico
	FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
20	DIG	digoxigenina
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	kb	kilobase
	µg	microgramo
	µL	microlitro
25	mL	mililitro
	M	masa molar
	OLP	sonda solapante
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	PTU	unidad de transcripción de plantas
30	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SNP	polimorfismo de un solo nucleótido
	SOP	procedimiento de trabajo estándar
	SSC	una solución tampón que contiene una mezcla de cloruro de 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
35	V	voltios

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Ensayo TAQMAN® de punto final de FAD-3c

Se desarrolló un ensayo TaqMan® de punto final para detectar la mutación del polimorfismo de un solo nucleótido en *fad-3c* y para determinar el estado de cigosidad de plantas de canola que contenían la mutación del gen *fad-3c* en poblaciones reproductoras. Se diseñaron dos cebadores para unir secuencias de DNA altamente conservadas localizadas en los exones 6 y 7 del gen *fad-3c*. Estos cebadores amplificaron un fragmento de DNA de 154 pb que se extendió a lo largo del polimorfismo de un solo nucleótido de *fad-s3c* en plantas de canola mutadas y no mutadas. La mutación en *fad-3c* en canola está descrita por Hu et al., (2006) y localizada en el exón 6 y la unión en el sitio del empalme del intrón 6 del gen (Fig. 1). Se diseñaron dos sondas desactivadoras no fluorescentes que se unían al surco menor (MGBNFQ) de TaqMan® con FAM y VIC como colorantes indicadores para detectar la presencia del

gen *fad-3c* de tipo natural y el gen *fad-3c* mutado (que consiste en un polimorfismo de un solo nucleótido, SNP), respectivamente. Estas dos sondas se diseñaron con consideraciones especiales para evitar un polimorfismo próximo localizado en el intrón 6 y muy próximo al polimorfismo de un solo nucleótido de *fad-3c* (Fig. 1). La evitación del segundo polimorfismo dio como resultado un aumento de la especificidad de las sondas para la detección de las plantas mutantes con *fad-3c*. El método de detección TaqMan® para plantas de canola que contenían el SNP del *fad-3c* fue analizado frente a la variedad de canola “NEX 828” (que contenía el SNP de *fad-3c*), la variedad de canola de control “Quantum” (que no contenía el SNP de *fad-3c*) y una muestra de DNA aislada de plantas que se sabía que eran heterocigóticas para el SNP de *fad-3c*. El ensayo TaqMan® de punto final se usó para determinar la presencia del SNP de *fad-3c* y también para determinar la cigosidad de las plantas que se analizaban en una aplicación con alto rendimiento, por ejemplo, formatos de placas de 96 y 384 pocillos.

### Ejemplo 1.1: Aislamiento de gDNA

En este estudio se analizaron muestras de DNA genómico (gDNA) de 156 plantas de canola diferentes que contenían la mutación en *fad-3c* y plantas de canola de control. El DNA genómico se extrajo utilizando el kit modificado de DNA de plantas Qiagen MagAttract (Qiagen, Valencia, CA). Para la extracción del gDNA se utilizaron discos de hojas de canola frescas, 4 por muestra. El gDNA se cuantificó con el método Pico Green de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Molecular Probes, Eugene, OR). Para los fines de este estudio se diluyeron las muestras con agua exenta de DNasa dando como resultado una concentración de 5 ng/μL.

### Ejemplo 1.2: Ensayo TaqMan® y resultados

Se diseñaron cebadores y sondas específicas para TaqMan® para usar en un ensayo TaqMan® de punto final. Estos cebadores y sondas se diseñaron para amplificar y detectar la región del gen *fad-3c* que comprendía el SNP de interés. Estos reactivos se pueden usar con las condiciones enumeradas a continuación para detectar el gen *fad-3c* mutado en plantas de canola. La Tabla 1 enumera las secuencias de cebadores y sondas que se desarrollaron específicamente para la detección del SNP del *fad-3c* en plantas de canola.

**Tabla 1. Cebadores y sondas para la PCR TaqMan**

SEQ ID NO:	Nombre	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO:2	D-CL-FAD3c-F	Cebador delantero	ACGATGATAAGCTGCCTTGGT
SEQ ID NO:3	D-CL-FAD3c-R	Cebador inverso	CAAGTACCTCAACAACCCTTTGGTCAACAGTTGTTAATCCTCCACGT
SEQ ID NO:4	D-CL-FAD3c-FAM	Sonda para detectar <i>fad-3c</i> mutante	6FAM-CAGAGGCAAGATAAGT-MGB
SEQ ID NO:5	D-CL-FAD3c-VIC	Sonda para detectar <i>fad-3c</i> de tipo natural	VIC-ACAGAGGCAAGGTAAGT-MGB

Las mezclas de reacción PCR para la amplificación son las siguientes: 1X TaqMan® GTEExpress Master Mix, cebador delantero 0,9 μM (SEQ ID NO: 2), cebador inverso 0,9 μM (SEQ ID NO: 3), sonda FAD-3C mutante 0,2 μM (SEQ ID NO: 4), sonda de tipo natural 0,2 μM (SEQ ID N°: 5), 15 ng de gDNA en una reacción total de 6 μL. La mezcla de reacción se amplificó usando las siguientes condiciones de ciclos térmicos: dos etapas iniciales de 50°C durante 2 minutos 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 entonces a 10°C hasta que se eliminaron del termociclador. El ciclo térmico de la PCR se puede realizar utilizando un 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 DNA de control de plantas de canola que eran homocigóticas para el *fad-3c* mutante (“NEX 828”), heterocigóticas para el *fad-3c* mutante u homocigóticas para el *fad-3c* de tipo natural (“Quantum”). Además, se incluyó un control sin molde que no contenía DNA. Después de la amplificación, se leyeron las señales fluorescentes de punto final (VIC y FAM) utilizando el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900 HT de acuerdo con el procedimiento de lectura de placas de discriminación alélica descrito por el fabricante. Los datos se analizaron luego utilizando el programa informático SDS 2.4 (Life Technologies, Carlsbad, CA) para determinar la fluorescencia relativa de cada muestra (Fig. 2).

El método de detección TaqMan® para la mutación en *fad-3c* en canola se realizó en muestras homocigóticas,

5 hemicigóticas y de tipo natural conocidas. 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. Este ensayo demostró alta especificidad para la detección de la mutación en *fad-3c* y del polimorfismo de un solo nucleótido de tipo natural en canola y no produjo ni amplificó ninguno de los resultados falsos positivos detectables de los controles. Los cebadores y sondas específicos del episodio se pueden usar para la detección del gen *fad-3c* mutante y *fad-3c* de tipo natural en canola y estas condiciones y reactivos son aplicables para ensayos de la cigosidad.

**Lista de secuencias**

- <110> Dow Agrosience
- 10 <120> Método para determinar la cigosidad del gen FAD3 en la canola utilizando PCR TAQMAN de punto final
  - <130> DAS-P0206-01-WO-E
  - <150> US 61/550,170
  - <151> 2011-10-21
  - <160> 5
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
  - <210> 1
  - <211> 282
  - <212> ADN
  - <213> secuencia artificial
- 20 <220>
  - <223> sección de la secuencia del gen fad-3c de canola
  - <400> 1
 

atcctttgtaa tgtggttggg cgctgtcacg tacttgcac atcatggtca cgatgataag	60
ctgccttggg acagaggcaa ggtaagtaga tcagcattat ttataagaag caataatgat	120
tagtagttga ataactctgaa tttttgatgt ttttgtacaa taataggaat ggagttat	180
acgtggagga ttaacaactg ttgatagaga ttacgggatc ttcaacaaca ttcacacga	240
tattggaact cacgtgatcc atcatctttt cccacaaatc cc	282
  - <210> 2
- 25 <211> 21
  - <212> ADN
  - <213> secuencia artificial
  - <220>
  - <223> cebador
- 30 <400> 2
  - acgatgataa gctgccttg t 21
  - <210> 3
  - <211> 24
  - <212> ADN
- 35 <213> secuencia artificial
  - <220>
  - <223> c
  - <400> 3
  - tcaacagttg ttaatcctcc acgt 24
- 40 <210> 4
  - <211> 16
  - <212> ADN
  - <213> secuencia artificial
  - <220>

<223> sonda

<400> 4

cagaggcaag ataagt 16

<210> 5

5 <211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda

10 <400> 5

acagaggcaa ggtaagt 17

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar la cigosidad de una planta de canola que comprende un gen *fad-3c*, comprendiendo dicho método:
  - obtener una muestra de DNA genómico de dicha planta de canola;
  - 5 producir una muestra de contacto poniendo en contacto dicha muestra de DNA genómico con un primer cebador y un segundo cebador, donde dicho primer cebador consiste en la SEQ ID NO: 2, que se une a una región de dicho gen *fad-3c* aguas arriba de una localización de un polimorfismo de un solo nucleótido de interés, donde dicho segundo cebador consiste en la SEQ ID NO: 3, que se une a una región de dicho gen *fad-3c* aguas abajo del polimorfismo de un solo nucleótido de interés, en el que dicho primer cebador y dicho segundo cebador producen un
    - 10 amplicón cuando se someten a las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
    - someter dicha muestra de contacto a condiciones de la PCR, en las que se produzca dicho amplicón;
    - permitir que cada una de una primera sonda fluorescente, cuya secuencia consista en SEQ ID NO: 5, y una segunda sonda fluorescente, cuya secuencia consiste en SEQ ID NO: 4,
    - 15 se hibriden con el amplicón durante un período de tiempo y en una temperatura entre 50-70 grados Celsius, hibridándose preferiblemente dicha primera sonda fluorescente con dicho amplicón cuando dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés no está presente en dicho amplicón, hibridándose preferiblemente dicha segunda sonda fluorescente con dicho amplicón cuando está presente en dicho amplicón dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés;
    - aumentar dicha temperatura después del período de tiempo especificado en la etapa de permisión;
    - 20 capturar dicha fluorescencia producida por cada una de dichas primera y segunda sondas durante la etapa de aumento; y
    - determinar la cigosidad de dicha planta de canola, comprendiendo la etapa de determinación una comparación de la fluorescencia producida por cada una de las primera y segunda sondas, donde la fluorescencia de las primera y segunda sondas refleja predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control positiva al SNP homocigótico, lo que indica la presencia de dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés, donde la fluorescencia de las primera y segunda sondas refleja predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control negativa al SNP homocigótico lo que indica una falta de la presencia de dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés y donde la fluorescencia de la primera y segunda sondas refleja predominantemente la fluorescencia producida en una muestra de control positiva al SNP heterocigótico lo que indica que dicha planta de canola comprende un primer alelo que incluye dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés y un segundo alelo que carece de dicho polimorfismo de un solo nucleótido de interés.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método se usa para la verificación de la introgresión de la reproducción de plantas de canola cruzadas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dichas primera y segunda sondas están marcadas tanto con un colorante fluorescente como con un desactivador.
  - 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 desactivador 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 desactivador MGB en el extremo 3' de dicha segunda sonda.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que los resultados de la 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 DNA se obtiene de una planta de canola en el campo.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de aumento comprende aumentar dicha temperatura en incrementos de temperatura sustancialmente uniformes durante un período de tiempo.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fluorescencia producida por cada una de dichas primera y segunda sondas 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, donde preferiblemente dicho primer cebador
  - 50 consiste en la SEQ ID NO: 2, dicho segundo cebador consiste en la SEQ ID NO: 3, dicha primera sonda consiste en la SEQ ID NO: 5 y dicha segunda sonda consiste en la SEQ ID NO: 4.

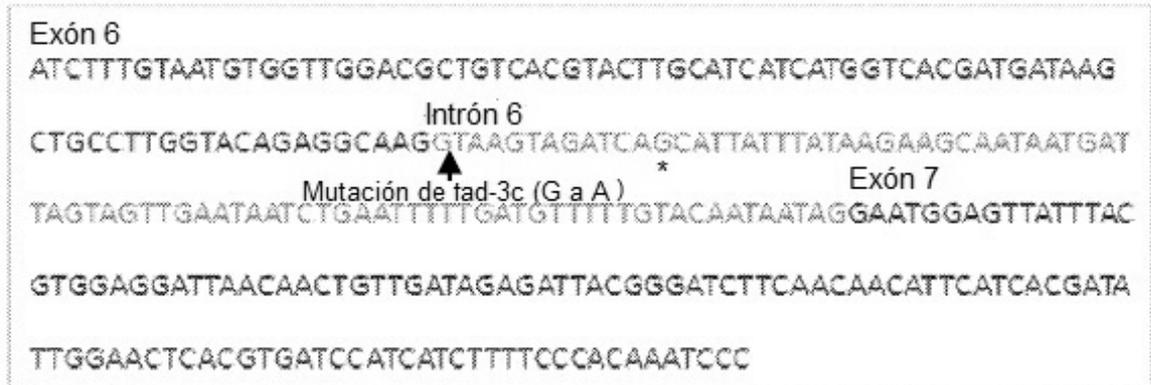
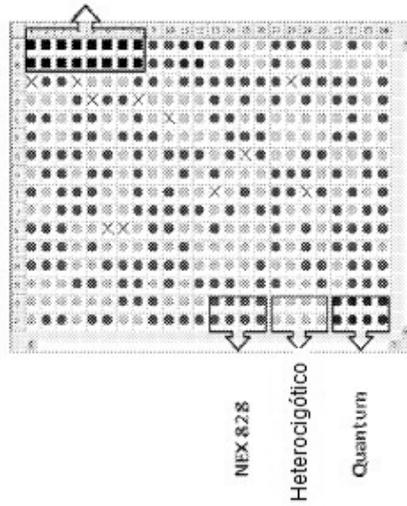


FIG. 1

Muestras de DNA en rejilla de placas

Sin controles de molde



Separación de la mutación del gen *fad 3c* en 3 agrupamientos - SDS 2,4 separados

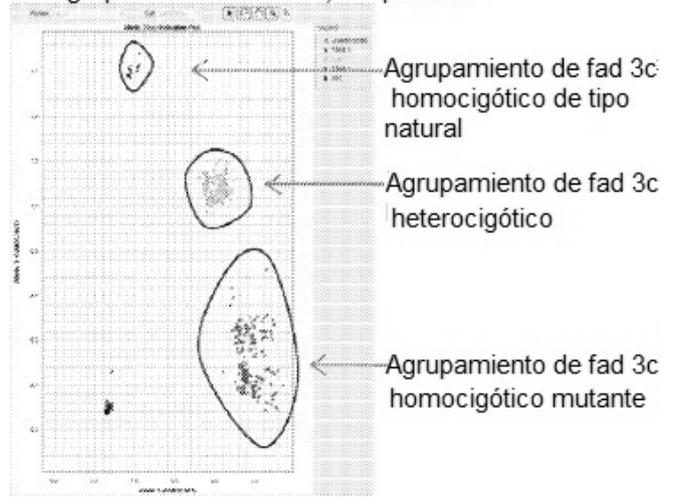


FIG. 2