

Q7



Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

Organization y  
Digitalization CSA Ltda

SOLICITUD DE



**PATENTE DE INVENCION**  
**PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

**09-124408**

21. EXPEDIENTE No. 09-124408

54. TITULO: PLANTAS DE ALGODÓN CON TOLERANCIA A INSECTOS  
Y METODOS PARA IDENTIFICARLAS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 15/82, A01H 5/00

71. SOLICITANTE: BAYER BIOSCIENCE N.V.

DOMICILIO: Technologiepark 38, BE-9052 Gent, BELGICA

74. APODERADO: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

22. BOGOTA, D.C., 04 NOV. 2009



No. 09-124408- -00000-0000

Fecha: 2009-11-04 14:51:24 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Evt. 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 140

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES**  
**PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: BAYER BIOSCIENCE N.V.

Dirección: Technologiepark 38  
BE-9052 Gent  
BELGICA

Nacionalidad o Domicilio: Gent, BELGICA

Lugar de Constitución: BELGICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE  
O APODERADO

Nombre: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

2.930.616

TPA

2.698

④

INVENTOR (ES) (72)

LINDA TROLINDER  
1417 8th Street  
79363 Shallowater, Texas  
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

DIMITRI PAELINCK  
Liniestraat 19  
BE-9160 Eksaarde  
BELGICA

HANS VAN HERCK  
Salphensebaan 16  
BE-2390 Malle  
BELGICA

SOFIE MOENS  
Oscar Declercqstraat 62  
BE-9750 Zingem  
BELGICA

VEERLE HABEX  
Hoge Voetweg 12  
BE-8560 Gullegem  
BELGICA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/002667

Fecha 31/03/2008

Publicación Internacional No. WO 2008/122406 A1

Fecha 16/10/2008

⑥

Título (54)

PLANTAS DE ALGODÓN CON TOLERANCIA A INSECTOS Y METODOS PARA IDENTIFICARLAS

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/82, A01H 5/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒

NO ☐

EP

05/04/2007

07075263,9

US

12/04/2007

60/923,142

EP

23/04/2007

07075299,3

⑨

Comprobantes de pago Nos.

09-81,918 y 09-81,919

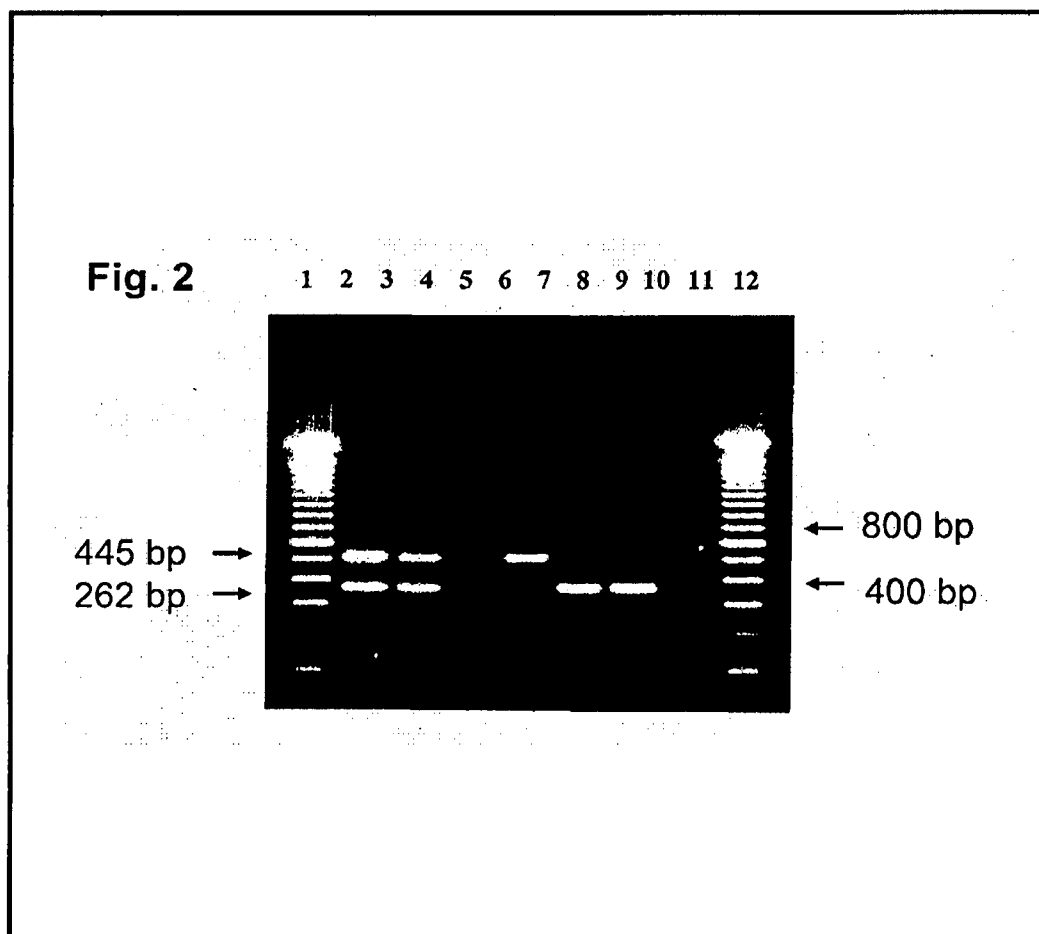
Fecha

Noviembre 3, 2009

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación y formas PCT/IB/306 (Notificación de Cambio)

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUIS PATINO LEYVA

FIRMA:

*[Handwritten Signature]*

C.C. No. 2.930.616 Bogotá - TPA 2.698 C.S.J.

04 NOV. 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 81,918  
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-124408- -00000-0000

Fecha: 2009-11-04 14:51:24 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 140

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| ALVARO CASTELLANOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 21970491 | 03/11/2009 | 4,059,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                       |                |
| 1     |             | TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 540,000.00     |
|       |             | TOTAL :                           | \$ 540,000.00  |

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE: \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 81,919

FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-124408- -00000-0000

Fecha: 2009-11-04 14:51:24

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONI

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 140

## \*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| ALVARO CASTELLANOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 21970491 | 03/11/2009 | 4,059,000.00 |

## \*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                           | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I     |                |
|       |             | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 750,000.00     |
|       |             | TOTAL :                            | \$ 750,000.00  |

SON: SETECIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA  
 COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER  
 SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
16 October 2008 (16.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/122406 A1**

(51) International Patent Classification:  
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/EP2008/002667

(22) International Filing Date: 31 March 2008 (31.03.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
07075263.9 5 April 2007 (05.04.2007) EP  
60/923,142 12 April 2007 (12.04.2007) US  
07075299.3 23 April 2007 (23.04.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER BIOSCIENCE N.V. [BE/BE]; Technologiepark 38, B-9052 Gent (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TROLINDER, Linda [US/US]; 1417 8th Street, Shallowater, TX 79363 (US). MOENS, Sofie [BE/BE]; Jagerstraat 1, B-9810 Eke (BE). PAELINCK, Dimitri [NL/BE]; Liniestraat 19, B-9160 Eksaarde (BE). HABEX, Veerle [BE/BE]; Hoge Voetweg 12, B-8560 Gullegem (BE). VAN HERCK, Hans [BE/BE]; Cypriaan de Rorestraat 6, B-2800 Mechelen (BE).

(74) Common Representative: BAYER BIOSCIENCE N.V.; Technologiepark 38, B-9052 Gent (BE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

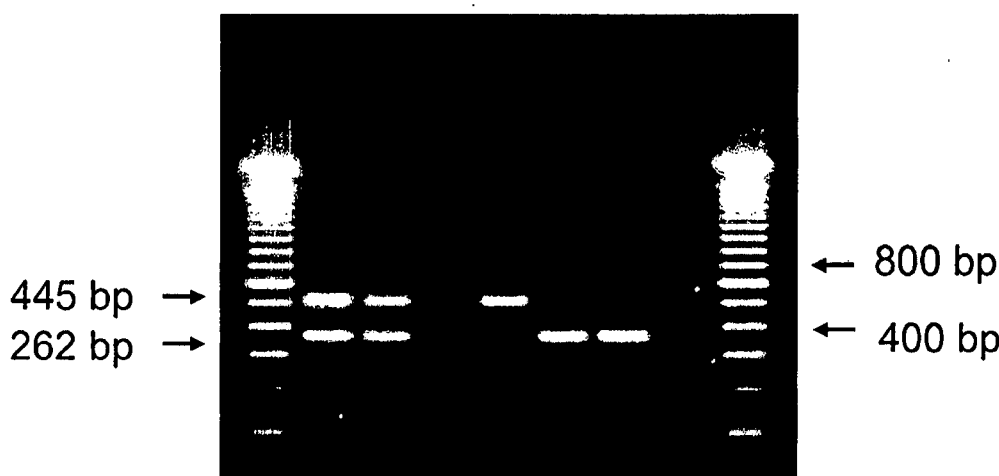
- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

[Continued on next page]

(54) Title: INSECT RESISTANT COTTON PLANTS AND METHODS FOR IDENTIFYING SAME

Fig. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



(57) Abstract: The invention provides specific transgenic cotton plants, plant material and seeds, characterized in that these products harbor a specific transformation event at a specific location in the cotton genome. Tools are also provided which allow rapid and unequivocal identification of the event in biological samples.

WO 2008/122406 A1



**Published:**

- *with international search report*
- *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
- *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description*
- *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

## **Insect resistant cotton plants and methods for identifying same.**

### Field of the invention

5 This invention relates to transgenic cotton plants, plant material and seeds, characterized by harboring a specific transformation event, particularly by the presence of a gene encoding a protein that confers insect resistance, at a specific location in the cotton genome. The cotton plants of the invention combine the insect resistance phenotype with an agronomic performance, genetic stability and adaptability to different genetic  
10 backgrounds equivalent to the non-transformed cotton line in the absence of insects. This invention further provides methods and kits for identifying the presence of plant material comprising specifically transformation event EE-GH5 in biological samples.

### Background of the invention

15 The phenotypic expression of a transgene in a plant is determined both by the structure of the gene itself and by its location in the plant genome. At the same time the presence of the transgene (in a foreign DNA) at different locations in the genome will influence the overall phenotype of the plant in different ways. The agronomically or industrially  
20 successful introduction of a commercially interesting trait in a plant by genetic manipulation can be a lengthy procedure dependent on different factors. The actual transformation and regeneration of genetically transformed plants are only the first in a series of selection steps, which include extensive genetic characterization, breeding, and evaluation in field trials, eventually leading to the selection of an elite event.

25 Cotton fiber is the single most important textile worldwide. About 80 million acres of cotton are harvested annually across the globe. Cotton is the fifth largest crop in the U.S. in terms of acreage production, with over 15 million acres planted in 2000.

30 The most damaging insect species feeding on cotton are *Helicoverpa zea* (corn earworm or cotton bollworm), *Helicoverpa armigera* (American bollworm) *Heliothis virescens* (tobacco budworm) and *Helicoverpa punctigera*.

The unequivocal identification of an elite event is becoming increasingly important in view of discussions on Novel Food/Feed, segregation of GMO and non-GMO products and the identification of proprietary material. Ideally, such identification method is both quick and simple, without the need for an extensive laboratory set-up. Furthermore, the method should provide results that allow unequivocal determination of the elite event without expert interpretation, but which hold up under expert scrutiny if necessary. Specific tools for use in the identification of elite event EE-GH5 in biological samples are described herein.

EE-GH5 has been identified as an elite event from a population of transgenic cotton plants in the development of insect resistant cotton (*Gossypium hirsutum*) comprising a gene coding for a insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. The transgenic cotton plants contain a chimeric gene encoding a Bt insecticidal crystal protein (as described in WO03/093484) under control of a plant-expressible promoter.

Cotton plants comprising a insect resistance gene have been disclosed in the art. However, none of the prior art disclosures teach or suggest the present invention.

#### Summary of the invention

The present invention relates to a transgenic cotton plant, or seed, cells or tissues thereof, comprising, stably integrated into its genome, an expression cassette which comprises a insect resistance gene comprising the coding sequence of the cry1Ab gene (as described in Example 1.1 herein), which is insect resistant and, in the absence of insect pressure, has an agronomic performance which is substantially equivalent to the non-transgenic isogenic line. Under insect pressure, the plant will have a superior agronomic phenotype compared to the non-transgenic plant.

According to the present invention the cotton plant or seed, cells or tissues thereof comprise elite event EE-GH5.

More specifically, the present invention relates to a transgenic cotton plant, seed, cells or tissues thereof, the genomic DNA of which is characterized by the fact that, when analyzed in a PCR identification protocol as described herein, using two primers directed to the 5' or 3' flanking region of EE-GH5 and the foreign DNA, respectively, yields a fragment which is specific for EE-GH5. The primers may be directed against the 5' flanking region within SEQ ID NO: 1 and the foreign DNA respectively such as the primers comprising or consisting of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 8 respectively, and yield a DNA fragment of between 100 and 700 bp, preferably of about 129 bp. The primers may also be directed against the 3' flanking region within SEQ ID NO: 2 and the foreign DNA respectively such as the primers comprising or consisting of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 6 respectively, and yield a DNA fragment of between 300 and 700 bp, preferably of about 369 bp.

Reference seed comprising the elite event of the invention has been deposited at the ATCC under accession number PTA-8171. One embodiment of the invention is the seed comprising elite event EE-GH5 deposited as ATTC accession number PTA-8171, which will grow into a cotton plant resistant to insects, particularly *Helicoverpa sp.* or *Heliothis sp.* The seed of ATCC deposit number PTA-8171, is a seed lot consisting of at least about 95% transgenic kernels homozygous for the transgene, comprising the elite event of the invention, which will grow into insect resistant plants, whereby the plants are also glufosinate tolerant plants. The seed can be sown and the growing plants can be treated with glufosinate as described herein to obtain 100% glufosinate tolerant plants, comprising the elite event of the invention. The invention further relates to cells, tissues, progeny, and descendants from a plant comprising the elite event of the invention grown from the seed deposited at the ATCC having accession number PTA-8171. The invention further relates to plants obtainable by propagation of and/or breeding with a cotton plant comprising the elite event of the invention grown from the seed deposited at the ATCC having accession number PTA-8171. The invention also relates to cotton plants comprising elite event EE-GH5.

The invention further relates to a method for identifying a transgenic plant, or cells or tissues thereof, comprising elite event EE-GH5 which method is based on identifying the presence of characterizing DNA sequences or amino acids encoded by such DNA sequences in the transgenic plant, cells or tissues. According to a preferred embodiment of the invention, such characterizing DNA sequences are sequences of 15bp, preferably 20bp, most preferably 30bp or more which comprise the insertion site of the event, i.e. both a part foreign DNA and a part of the cotton genome (either the 5' or 3' flanking region) contiguous therewith, allowing specific identification of the elite event.

- 10 The present invention further relates to methods for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, which methods are based on primers or probes which specifically recognize the 5' and/or 3' flanking sequence of EE-GH5.

More specifically, the invention relates to a method comprising of amplifying a sequence of a nucleic acid present in biological samples, using a polymerase chain reaction with at least two primers, one of which recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5, the other which recognizes a sequence within the foreign DNA, preferably to obtain a DNA fragment of between 100 and 500 bp. The primers may recognize a sequence within the 5' flanking region of EE-GH5 (SEQ ID No. 1, from position 1 to position 98 or SEQ ID No. 16 from position 1 to 563) or within the 3' flanking region of EE-GH5 (complement of SEQ ID No 2 from position 41 to position 452) and a sequence within the foreign DNA (complement of SEQ ID No 1 from position 99 to 334 or SEQ ID No 2 from position 1 to position 40), respectively. The primer recognizing the 5' flanking region may comprise the nucleotide sequence of SEQ ID No. 7 or SEQ ID No. 17 and the primer recognizing a sequence within the foreign DNA may comprise the nucleotide sequence of SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 18 or SEQ ID No. 19 described herein. The primer recognizing the 3' flanking region may comprise the nucleotide sequence of SEQ ID No. 6 and the primer recognizing a sequence within the foreign DNA may comprise the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3 described herein

30

The present invention more specifically relates to a method for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, which method comprises amplifying a sequence of a

nucleic acid present in a biological sample, using a polymerase chain reaction with two primers having the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 6 respectively, to obtain a DNA fragment of about 369 bp.

- 5 The current elite event comprises a foreign DNA sequence wherein a slight rearrangement has occurred when compared with the DNA initially used for the transformation procedure, the rearrangement being unique for elite event EE-GH5. Accordingly, the invention also relates to a method for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, which method comprises amplifying a sequence of a nucleic acid  
10 present in a biological sample, using a polymerase chain reaction with two primers flanking the unique rearrangement of foreign DNA in EE-GH5, such as the primers comprising or having the nucleotide sequence of SEQ ID No 10 and SEQ ID No 11, to obtain a DNA fragment of about 262 bp.
- 15 The present invention further relates to the specific flanking sequences of EE-GH5 described herein, which can be used to develop specific identification methods for EE-GH5 in biological samples. Such specific flanking sequences may also be used as reference control material in identification assays. More particularly, the invention relates to the 5' and or 3' flanking regions of EE-GH5 which can be used for the  
20 development of specific primers and probes as further described herein. The invention also relates to nucleic acid molecules spanning the specific rearrangements within the foreign DNA of EE-GH5, such as a nucleic acid molecule comprising the sequence of SEQ ID No. 12 from nucleotide position 52 to nucleotide position 88, or comprising the sequence of SEQ ID No.12. Also suitable as reference material are nucleic acid  
25 molecules, preferably of about 369 bp, comprising the sequence which can be amplified by primers having the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 6

The invention further relates to identification methods for the presence of EE-GH5 in biological samples based on the use of such specific primers or probes. Primers may  
30 consist of a nucleotide sequence of 17 to about 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 of the nucleotide sequence of SEQ ID No. 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or the

- complement of the nucleotide sequence of SEQ ID 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452) combined with primers consisting of a nucleotide sequence of 17 to about 200 consecutive nucleotides selected from the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40. Primers may also comprise these nucleotide sequences located at their extreme 3' end, and further comprise unrelated sequences or sequences derived from the mentioned nucleotide sequences, but comprising mismatches.
- 10 The invention further relates to kits for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, said kits comprising at least one primer or probe which specifically recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5 or the specific rearrangement within the foreign DNA sequence in EE-GH5.
- 15 The kit of the invention may comprise, in addition to a primer which specifically recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5, a second primer which specifically recognizes a sequence within the foreign DNA of EE-GH5, for use in a PCR identification protocol. The kits of the invention may comprise at least two specific primers, one of which recognizes a sequence within the 5' flanking region of EE-GH5, and the other which recognizes a sequence within the foreign DNA. The primer recognizing the 5' flanking region may comprises the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3 and the primer recognizing the transgene may comprises the nucleotide sequence of SEQ ID No. 6 or any other primer as described herein.
- 20
- 25 The invention further relates to a kit for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, said kit comprising the PCR primers having the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 6 for use in the EE-GH5 PCR identification protocol described herein. The invention further relates to a kit for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, said kit comprising the PCR primers having the nucleotide sequence of SEQ ID No. 10 and SEQ ID No. 11.
- 30

The invention also relates to a kit for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, which kit comprises a specific probe having a sequence which corresponds (or is complementary to) a sequence having between 80% and 100% sequence identity with a specific region of EE-GH5. Preferably, the sequence of the probe corresponds to a specific region comprising part of the 5' or 3' flanking region of EE-GH5 or to a region corresponding to the rearrangement of foreign DNA specific for EE-GH5. Most preferably the specific probe has (or is complementary to) a sequence having between 80% and 100% sequence identity to the sequence between nucleotide 78 to 119 of SEQ ID No 1 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 61 or SEQ ID 12 from nucleotide 52 to nucleotide 88.

According to another aspect of the invention, DNA sequences are disclosed comprising the insertion site of the event and sufficient length of polynucleotides of both the cotton genomic DNA and the foreign DNA (transgene), so as to be useful as primer or probe for the detection of EE-GH5. Such sequences may comprise at least 9 nucleotides of the cotton genomic DNA and a similar number of nucleotides of the foreign DNA (transgene) of EE-GH5 therewith at each side of the insertion site respectively. Most preferably, such DNA sequences comprise at least 9 nucleotides of the cotton genomic DNA and a similar number of nucleotides of the foreign DNA contiguous with the insertion site in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2.

The methods and kits encompassed by the present invention can be used for different purposes such as, but not limited to the following: to identify the presence or absence of EE-GH5 in plants, plant material or in products such as, but not limited to food or feed products (fresh or processed) comprising or derived from plant material; additionally or alternatively, the methods and kits of the present invention can be used to identify transgenic plant material for purposes of segregation between transgenic and non-transgenic material; additionally or alternatively, the methods and kits of the present invention can be used to determine the quality (i.e. percentage pure material) of plant material comprising EE-GH5.

The invention further relates to the 5' and/or 3' flanking regions of EE-GH5 as well as to the specific primers and probes developed from the 5' and/or 3' flanking sequences of EE-GH5. The invention also relates to the EE-GH5 specific rearrangement region, as well as to specific primers or probes developed from that region.

5

The invention also relates to genomic DNA obtained from plants comprising elite event EE-GH5. Such genomic DNA may be used as reference control material in the identification assays herein described.

10 Brief description of the drawings

The following Examples, not intended to limit the invention to specific embodiments described, may be understood in conjunction with the accompanying Figure, incorporated herein by reference, in which:

15

**Fig. 1: represents schematically the relationship between the cited nucleotide sequences and primers.** black bar: foreign DNA; striped black bar: rearrangement in the foreign DNA specific for EE-GH5; light bar: DNA of plant origin; striped light bar: pre-insertion target deletion; arrows: oligonucleotide primers, the figures under the bars represent nucleotide positions; (c) refers to complement of the indicated nucleotide sequence.

20

**Fig. 2: represents results obtained by the PCR Identification protocol developed for EE-GH5.** Loading sequence of the gel: Lane1: Molecular weight marker (100 bp ladder); lanes 2 to 3: DNA samples from cotton plants comprising the transgenic event EE-GH5; lanes 4 to 10: DNA samples from transgenic cotton plants not comprising elite event EE-GH5, but comprising a similar insect-resistance gene; lane 11: no template DNA control; lane 12: molecular weight marker.

25

**Fig. 3: represents results obtained by the zygosity scoring PCR protocol developed for EE-GH5.** Loading sequence of the gel: Lane1: Molecular weight marker (100 bp ladder); lanes 2 and 3: DNA samples from cotton plants comprising the transgenic event EE-GH5 in heterozygous form; lanes 4: Fail Lane 5: control

30

DNA sample from wild-type cotton plant; lanes 6-7; DNA sample from cotton plants comprising the transgenic event EE-GH5 in homozygous form lane 8: no template DNA control; lane 9: molecular weight marker.

5 Detailed description

The incorporation of a recombinant DNA molecule in the plant genome typically results from transformation of a cell or tissue. The particular site of incorporation is usually due to "random" integration.

10

The DNA introduced into the plant genome as a result of transformation of a plant cell or tissue with a recombinant DNA or "transforming DNA", and originating from such transforming DNA is hereinafter referred to as "foreign DNA" comprising one or more "transgenes". "Plant DNA" in the context of the present invention will refer to DNA  
15 originating from the plant which is transformed. Plant DNA will usually be found in the same genetic locus in the corresponding wild-type plant. The foreign DNA can be characterized by the location and the configuration at the site of incorporation of the recombinant DNA molecule in the plant genome. The site in the plant genome where a recombinant DNA has been inserted is also referred to as the "insertion site" or "target  
20 site". Insertion of the recombinant DNA into the region of the plant genome referred to as "pre-insertion plant DNA" can be associated with a deletion of plant DNA, referred to as "target site deletion". A "flanking region" or "flanking sequence" as used herein refers to a sequence of at least 20 bp, preferably at least 50 bp, and up to 5000 bp of DNA different from the introduced DNA, preferably DNA from the plant genome which  
25 is located either immediately upstream of and contiguous with or immediately downstream of and contiguous with the foreign DNA. Transformation procedures leading to random integration of the foreign DNA will result in transformants with different flanking regions, which are characteristic and unique for each transformant. When the recombinant DNA is introduced into a plant through traditional crossing, its  
30 insertion site in the plant genome, or its flanking regions will generally not be changed. An "insertion region" as used herein refers to the region corresponding to the region of at least 40 bp, preferably at least 100 bp, and up to 10000 bp, encompassed by the

sequence which comprises the upstream and/or the downstream flanking region of a foreign DNA in the plant genome. Taking into consideration minor differences due to mutations within a species, an insertion region will retain, upon crossing into a plant of the same species, at least 85%, preferably 90%, more preferably 95%, and most preferably 100% sequence identity with the sequence comprising the upstream and downstream flanking regions of the foreign DNA in the plant originally obtained from transformation.

An event is defined as a (artificial) genetic locus that, as a result of genetic engineering, carries a transgene comprising at least one copy of a gene of interest. The typical allelic states of an event are the presence or absence of the foreign DNA. An event is characterized phenotypically by the expression of the transgene. At the genetic level, an event is part of the genetic make-up of a plant. At the molecular level, an event can be characterized by the restriction map (e.g. as determined by Southern blotting), by the upstream and/or downstream flanking sequences of the transgene, the location of molecular markers and/or the molecular configuration of the transgene. Usually transformation of a plant with a transforming DNA comprising at least one gene of interest leads to a population of transformants comprising a multitude of separate events, each of which is unique.

An elite event, as used herein, is an event which is selected from a group of events, obtained by transformation with the same transforming DNA or by back-crossing with plants obtained by such transformation, based on the expression and stability of the transgene(s) and its compatibility with optimal agronomic characteristics of the plant comprising it. Thus the criteria for elite event selection are one or more, preferably two or more, advantageously all of the following:

- a) That the presence of the foreign DNA does not compromise other desired characteristics of the plant, such as those relating to agronomic performance or commercial value;
- b) That the event is characterized by a well defined molecular configuration which is stably inherited and for which appropriate tools for identity control can be developed;

c) That the gene(s) of interest show(s) a correct, appropriate and stable spatial and temporal phenotypic expression, both in heterozygous (or hemizygous) and homozygous condition of the event, at a commercially acceptable level in a range of environmental conditions in which the plants carrying the event are likely to be exposed in normal agronomic use.

It is preferred that the foreign DNA is associated with a position in the plant genome that allows easy introgression into desired commercial genetic backgrounds.

The status of an event as an elite event is confirmed by introgression of the elite event in different relevant genetic backgrounds and observing compliance with one, two or all of the criteria e.g. a), b) and c) above.

An "elite event" thus refers to a genetic locus comprising a foreign DNA, which answers to the above-described criteria. A plant, plant material or progeny such as seeds can comprise one or more elite events in its genome.

The tools developed to identify an elite event or the plant, plant material comprising an elite event, or products which comprise plant material comprising the elite event are based on the specific genomic characteristics of the elite event, such as, a specific restriction map of the genomic region comprising the foreign DNA, molecular markers or the sequence of the flanking region(s) of the foreign DNA.

Once one or both of the flanking regions of the foreign DNA have been sequenced, primers and probes can be developed which specifically recognize this (these) sequence(s) in the nucleic acid (DNA or RNA) of a sample by way of a molecular biological technique. For instance a PCR method can be developed to identify the elite event in biological samples (such as samples of plants, plant material or products comprising plant material). Such a PCR is based on at least two specific "primers" one recognizing a sequence within the 5' or 3' flanking region of the elite event and the other recognizing a sequence within the foreign DNA. The primers preferably have a sequence of between 15 and 35 nucleotides which under optimized PCR conditions "specifically recognize" a sequence within the 5' or 3' flanking region of the elite event and the foreign DNA of the elite event respectively, so that a specific fragment

("integration fragment" or discriminating amplicon) is amplified from a nucleic acid sample comprising the elite event. This means that only the targeted integration fragment, and no other sequence in the plant genome or foreign DNA, is amplified under optimized PCR conditions.

5

PCR primers suitable for the invention may be the following:

- oligonucleotides ranging in length from 17 nt to about 100 nt, comprising a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides, preferably 20 consecutive nucleotides selected from the 5' flanking sequence (SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to 563) at their 3' end (primers recognizing 5' flanking sequences); or
- oligonucleotides ranging in length from 17 nt to about 200 nt, comprising a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides, preferably 20 consecutive nucleotides, selected from the 3' flanking sequence (complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452) at their 3' end (primers recognizing 3' flanking sequences); or
- oligonucleotides ranging in length from 17 nt to about 200 nt, comprising a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides, preferably 20 nucleotides selected from the inserted DNA sequences (complement of SEQ ID No 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334) at their 3' end (primers recognizing foreign DNA) or
- oligonucleotides ranging in length from 17 nt to about 40 nt, comprising a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides, preferably 20 nucleotides selected from the inserted DNA sequences (SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40)

The primers may of course be longer than the mentioned 17 consecutive nucleotides, and may e.g. be 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt long or even longer. The primers may entirely consist of nucleotide sequence selected from the mentioned nucleotide sequences of flanking sequences and foreign DNA sequences. However, the nucleotide sequence of the primers at their 5' end (i.e. outside of the 3'-located 17 consecutive nucleotides) is less critical. Thus, the 5' sequence of the primers may consist of a

nucleotide sequence selected from the flanking sequences or foreign DNA, as appropriate, but may contain several (e.g. 1, 2, 5, 10 mismatches). The 5' sequence of the primers may even entirely consist of a nucleotide sequence unrelated to the flanking sequences or foreign DNA, such as e.g. a nucleotide sequence representing restriction enzyme recognition sites. Such unrelated sequences or flanking DNA sequences with mismatches should preferably be not longer than 100, more preferably not longer than 50 or even 25 nucleotides.

Moreover, suitable primers may comprise or consist of a nucleotide sequence at their 3' end spanning the joining region between the plant DNA derived sequences and the foreign DNA sequences (located at nucleotides 98-99 in SEQ ID No 1 and nucleotides 40-41 in SEQ ID No 2) provided the mentioned 3'-located 17 consecutive nucleotides are not derived exclusively from either the foreign DNA or plant-derived sequences in SEQ ID No 1 or 2.

It will also be immediately clear to the skilled artisan that properly selected PCR primer pairs should also not comprise sequences complementary to each other.

For the purpose of the invention, the "complement of a nucleotide sequence represented in SEQ ID No: X" is the nucleotide sequence which can be derived from the represented nucleotide sequence by replacing the nucleotides through their complementary nucleotide according to Chargaff's rules ( $A \rightleftharpoons T$ ;  $G \rightleftharpoons C$ ) and reading the sequence in the 5' to 3' direction, i.e in opposite direction of the represented nucleotide sequence.

Examples of suitable primers are the oligonucleotide sequences of SEQ ID No 7 or SEQ ID No 17 (5' flanking sequence recognizing primers), SEQ ID No 8, SEQ ID No 18 or SEQ ID No 19 (foreign DNA recognizing primers for use with the 5' flanking sequence recognizing primers), SEQ ID No 3 (foreign DNA recognizing primers for use with the 3' flanking sequence recognizing primers), SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 (3' flanking sequence recognizing primers) and SEQ ID Nos 10 and 11 (primers recognizing the specific foreign DNA rearrangement in EE-GH5).

Other examples of suitable oligonucleotide primers comprise at their 3' end the following sequences or consist of such sequences:

a. 5' flanking sequence recognizing primers:

- the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 58 to nucleotide 77
- 5 - the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 85 to nucleotide 104
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 150 to nucleotide 166
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 150 to nucleotide 171
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 154 to nucleotide 171
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 87 to nucleotide 104
- 10 - the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 189 to nucleotide 206

b. foreign DNA sequence recognizing primers for use with 5' flanking sequence recognizing primers:

- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 149 to nucleotide 170
- 15 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 169 to nucleotide 186
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 193 to nucleotide 212
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 161 to nucleotide 178
- 20 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 194 to nucleotide 211
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 193 to nucleotide 211
- 25 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 163 to nucleotide 185
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 194 to nucleotide 210
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 193 to nucleotide 210
- 30 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 193 to nucleotide 209

## c. 3' flanking sequence recognizing primers:

- 5       - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 149 to nucleotide 168
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 154 to nucleotide 173
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 140 to nucleotide 159
- 10      - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 141 to nucleotide 160
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 147 to nucleotide 166
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 167
- 15      - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 149 to nucleotide 167
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 153 to nucleotide 172
- 20      - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 154 to nucleotide 174
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 160 to nucleotide 177
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 232 to nucleotide 251
- 25      - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 140 to nucleotide 160
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 141 to nucleotide 161
- 30      - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 147 to nucleotide 165

- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 149 to nucleotide 166
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 166
- 5 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 147 to nucleotide 167
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 168
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 153 to nucleotide 173
- 10 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 154 to nucleotide 175
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 156 to nucleotide 175
- 15 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 232 to nucleotide 250
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 140 to nucleotide 157
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 140 to nucleotide 161
- 20 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 141 to nucleotide 162
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 165
- 25 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 149 to nucleotide 165
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 147 to nucleotide 168
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 169
- 30 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 156 to nucleotide 174

- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 153 to nucleotide 174
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 232 to nucleotide 249
- 5 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 234 to nucleotide 251
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 141 to nucleotide 163
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 148 to nucleotide 164
- 10 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 147 to nucleotide 169
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 153 to nucleotide 175
- 15 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 156 to nucleotide 177
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 181 to nucleotide 198
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 181 to nucleotide 202
- 20 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 234 to nucleotide 250
- the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 140 to nucleotide 162
- 25 - the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 181 to nucleotide 203

d. foreign DNA sequence recognizing primers for use with 3' flanking sequence

30 recognizing primers:

- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 30 to nucleotide 49
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 30 to nucleotide 48

- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 32 to nucleotide 48
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 32 to nucleotide 49
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 31 to nucleotide 49
- the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 31 to nucleotide 48
- 5 - the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 30 to nucleotide 46

As used herein, "the nucleotide sequence of SEQ ID No. Z from position X to position Y" indicates the nucleotide sequence including both nucleotide endpoints.

- 10 Preferably, the amplified fragment has a length of between 50 and 500 nucleotides, most preferably of between 100 and 350 nucleotides. The specific primers may have a sequence which is between 80 and 100% identical to a sequence within the 5' or 3' flanking region of the elite event and the foreign DNA of the elite event, respectively, provided the mismatches still allow specific identification of the elite event with these
- 15 primers under optimized PCR conditions. The range of allowable mismatches however, can easily be determined experimentally and are known to a person skilled in the art.

The following table exemplifies the sizes of expected DNA amplicons (or integration fragments) with selected pairs of PCR primers.

20

| Primer 1 | From position | Primer 2 | To position | Length amplicon |
|----------|---------------|----------|-------------|-----------------|
| HVH024   | 58            | DPA312   | 186         | 128             |
| GHI057   | 1             | MAE115   | 175         | 175             |
| GHI057   | 1             | HVH022   | 251         | 251             |
| GHI057   | 1             | GHI065   | 369         | 369             |

- Detection of integration fragments can occur in various ways e.g. via size estimation after gel analysis. The integration fragments may also be directly sequenced. Other sequence specific methods for detection of amplified DNA fragments are also known in
- 25 the art.

As the sequence of the primers and their relative location in the genome are unique for the elite event, amplification of the integration fragment will occur only in biological samples comprising (the nucleic acid of) the elite event. Preferably when performing a PCR to identify the presence of EE-GH5 in unknown samples, a control is included of a set of primers with which a fragment within a "housekeeping gene" of the plant species of the event can be amplified. Housekeeping genes are genes that are expressed in most cell types and which are concerned with basic metabolic activities common to all cells. Preferably, the fragment amplified from the housekeeping gene is a fragment which is larger than the amplified integration fragment. Depending on the samples to be analyzed, other controls can be included.

Standard PCR protocols are described in the art, such as in "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999) and other references. The optimal conditions for the PCR, including the sequence of the specific primers, is specified in a "PCR identification protocol" for each elite event. It is however understood that a number of parameters in the PCR identification protocol may need to be adjusted to specific laboratory conditions, and may be modified slightly to obtain similar results. For instance, use of a different method for preparation of DNA may require adjustment of, for instance, the amount of primers, polymerase and annealing conditions used. Similarly, the selection of other primers may dictate other optimal conditions for the PCR identification protocol. These adjustments will however be apparent to a person skilled in the art, and are furthermore detailed in current PCR application manuals such as the one cited above.

Alternatively, specific primers can be used to amplify an integration fragment that can be used as a "specific probe" for identifying EE-GH5 in biological samples. Contacting nucleic acid of a biological sample, with the probe, under conditions which allow hybridization of the probe with its corresponding fragment in the nucleic acid, results in the formation of a nucleic acid/probe hybrid. The formation of this hybrid can be detected (e.g. labeling of the nucleic acid or probe), whereby the formation of this hybrid indicates the presence of EE-GH5. Such identification methods based on hybridization with a specific probe (either on a solid phase carrier or in solution) have

been described in the art. The specific probe is preferably a sequence which, under optimized conditions, hybridizes specifically to a region within the 5' or 3' flanking region of the elite event and preferably also comprising part of the foreign DNA contiguous therewith (hereinafter referred to as "specific region"). Preferably, the specific probe comprises a sequence of between 50 and 500 bp, preferably of 100 to 350 bp which is at least 80%, preferably between 80 and 85%, more preferably between 85 and 90%, especially preferably between 90 and 95%, most preferably between 95% and 100% identical (or complementary) to the nucleotide sequence of a specific region. Preferably, the specific probe will comprise a sequence of about 15 to about 100 contiguous nucleotides identical (or complementary) to a specific region of the elite event.

Oligonucleotides suitable as PCR primers for detection of the elite event EE-GH5 can also be used to develop a PCR-based protocol to determine the zygosity status of the elite event. To this end, two primers recognizing the wild-type locus are designed in such a way that they are directed towards each other and have the insertion site located in between the primers. These primers may be primers specifically recognizing the 5' and 3' flanking sequences contained within SEQ ID NO 1 or 2, respectively. These primers may also be primers specifically recognizing the 5' or 3' flanking sequence (such as a primer having the nucleotide sequence of SEQ ID No 7 or SEQ ID Nos 4-6) as well as a primer recognizing the region deleted during EE-GH5 insertion within the pre-insertion plant DNA). This set of primers, together with a third primer complementary to transforming DNA sequences (such as a primer having the nucleotide sequence of SEQ ID No 3) allow diagnostic PCR amplification of the EE-GH5 specific locus, as well as of the wt locus. If the plant is homozygous for the transgenic locus or the corresponding wt locus, the diagnostic PCR will give rise to a single PCR product typical, preferably typical in length, for either the transgenic or wt locus. If the plant is hemizygous for the transgenic locus, two locus specific PCR products will appear, reflecting both the amplification of the transgenic and wt locus.

Furthermore, detection methods specific for elite event EE-GH5 which differ from PCR based amplification methods can also be developed using the elite event specific

sequence information provided herein. Such alternative detection methods include linear signal amplification detection methods based on invasive cleavage of particular nucleic acid structures, also known as Invader™ technology, (as described e.g. in US patent 5,985,557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage, incorporated herein by reference). To this end, the target sequence may hybridized with a labeled first nucleic acid oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 99 to nucleotide 116 or its complement or said labeled nucleic acid probe comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 23 to nucleotide 40 or its complement and is further hybridized with a second nucleic acid oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 81 to nucleotide 98 or its complement or said labeled nucleic acid probe comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 58 or its complement, wherein the first and second oligonucleotide overlap by at least one nucleotide. The duplex or triplex structure which is produced by this hybridization allows selective probe cleavage with an enzyme (Cleavase®) leaving the target sequence intact. The cleaved labeled probe is subsequently detected, potentially via an intermediate step resulting in further signal amplification.

A "kit" as used herein refers to a set of reagents for the purpose of performing the method of the invention, more particularly, the identification of the elite event EE-GH5 in biological samples or the determination of the zygoty status of EE-GH5 containing plant material. More particularly, a preferred embodiment of the kit of the invention comprises at least one or two specific primers, as described above for identification of the elite event, or three specific primers for the determination of the zygoty status. Optionally, the kit can further comprise any other reagent described herein in the PCR identification protocol. Alternatively, according to another embodiment of this invention, the kit can comprise a specific probe, as described above, which specifically hybridizes with nucleic acid of biological samples to identify the presence of EE-GH5 therein. Optionally, the kit can further comprise any other reagent (such as but not limited to hybridizing buffer, label) for identification of EE-GH5 in biological samples, using the specific probe.

The kit of the invention can be used, and its components can be specifically adjusted, for purposes of quality control (e.g., purity of seed lots), detection of the presence or absence of the elite event in plant material or material comprising or derived from plant material, such as but not limited to food or feed products.

As used herein, "sequence identity" with regard to nucleotide sequences (DNA or RNA), refers to the number of positions with identical nucleotides divided by the number of nucleotides in the shorter of the two sequences. The alignment of the two nucleotide sequences is performed by the Wilbur and Lipmann algorithm (Wilbur and Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) using a window-size of 20 nucleotides, a word length of 4 nucleotides, and a gap penalty of 4. Computer-assisted analysis and interpretation of sequence data, including sequence alignment as described above, can, e.g., be conveniently performed using the sequence analysis software package of the Genetics Computer Group (GCG, University of Wisconsin Biotechnology center). Sequences are indicated as "essentially similar" when such sequences have a sequence identity of at least about 75%, particularly at least about 80%, more particularly at least about 85%, quite particularly about 90%, especially about 95%, more especially about 100%. It is clear that when RNA sequences are said to be essentially similar or have a certain degree of sequence identity with DNA sequences, thymidine (T) in the DNA sequence is considered equal to uracil (U) in the RNA sequence.

The term "primer" as used herein encompasses any nucleic acid that is capable of priming the synthesis of a nascent nucleic acid in a template-dependent process, such as PCR. Typically, primers are oligonucleotides from 10 to 30 nucleotides, but longer sequences can be employed. Primers may be provided in double-stranded form, though the single-stranded form is preferred. Probes can be used as primers, but are designed to bind to the target DNA or RNA and need not be used in an amplification process.

The term "recognizing" as used herein when referring to specific primers, refers to the fact that the specific primers specifically hybridize to a nucleic acid sequence in the elite

event under the conditions set forth in the method (such as the conditions of the PCR identification protocol), whereby the specificity is determined by the presence of positive and negative controls.

- 5 The term "hybridizing" as used herein when referring to specific probes, refer to the fact that the probe binds to a specific region in the nucleic acid sequence of the elite event under standard stringency conditions. Standard stringency conditions as used herein refers to the conditions for hybridization described herein or to the conventional hybridizing conditions as described by Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) which
- 10 for instance can comprise the following steps: 1) immobilizing plant genomic DNA fragments on a filter, 2) prehybridizing the filter for 1 to 2 hours at 42°C in 50% formamide, 5 X SSPE, 2 X Denhardt's reagent and 0.1% SDS, or for 1 to 2 hours at 68°C in 6 X SSC, 2 X Denhardt's reagent and 0.1% SDS, 3) adding the hybridization
- 15 probe which has been labeled, 4) incubating for 16 to 24 hours, 5) washing the filter for 20 min. at room temperature in 1X SSC, 0.1 %SDS, 6) washing the filter three times for 20 min. each at 68°C in 0.2 X SSC, 0.1 %SDS, and 7) exposing the filter for 24 to 48 hours to X-ray film at -70°C with an intensifying screen.
- 20 As used in herein, a biological samples is a sample of a plant, plant material or products comprising plant material. The term "plant" is intended to encompass cotton (*Gossypium hirsutum*) plant tissues, at any stage of maturity, as well as any cells, tissues, or organs taken from or derived from any such plant, including without limitation, any seeds, leaves, stems, flowers, roots, single cells, gametes, cell cultures, tissue cultures or
- 25 protoplasts. "Plant material", as used herein refers to material which is obtained or derived from a plant. Products comprising plant material relate to food, feed or other products which are produced using plant material or can be contaminated by plant material. It is understood that, in the context of the present invention, such biological samples are tested for the presence of nucleic acids specific for EE-GH5, implying the
- 30 presence of nucleic acids in the samples. Thus the methods referred to herein for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, relate to the identification in biological samples of nucleic acids which comprise the elite event.

As used herein “comprising” is to be interpreted as specifying the presence of the stated features, integers, steps, reagents or components as referred to, but does not preclude the presence or addition of one or more features, integers, steps or components, or groups thereof. Thus, e.g., a nucleic acid or protein comprising a sequence of nucleotides or amino acids, may comprise more nucleotides or amino acids than the actually cited ones, i.e., be embedded in a larger nucleic acid or protein. A chimeric gene comprising a DNA sequence which is functionally or structurally defined, may comprise additional DNA sequences, etc.

The present invention also relates to the development of an elite event EE-GH5 in cotton to the plants comprising this event, the progeny obtained from these plants and to the plant cells, or plant material derived from this event. Plants comprising elite event EE-GH5 were obtained described in example 1.

Cotton plants or plant material comprising EE-GH5 can be identified according to the PCR identification protocol described for EE-GH5 in Example 2. Briefly, cotton genomic DNA present in the biological sample is amplified by PCR using a primer which specifically recognizes a sequence within the 5’ or 3’ flanking sequence of EE-GH5 such as the primer with the sequence of SEQ ID NO: 6, and a primer which recognizes a sequence in the foreign DNA, such as the primer with the sequence of SEQ ID NO: 3. DNA primers which amplify part of an endogenous cotton sequence are used as positive control for the PCR amplification. If upon PCR amplification, the material yields a fragment of the expected size, the material contains plant material from a cotton plant harboring elite event EE-GH5.

Plants harboring EE-GH5 are characterized by their insect resistance, as well as by their glufosinate tolerance. Plants harboring EE-GH5 are also characterized by having agronomical characteristics that are comparable to commercially available varieties of cotton in the US, in the absence of insect pressure. It has been observed that the presence of a foreign DNA in the insertion region of the cotton plant genome described herein,

confers particularly interesting phenotypic and molecular characteristics to the plants comprising this event.

5 The following examples describe the identification of elite event EE-GH5 and the development of tools for the specific identification of elite event EE-GH5 in biological samples.

10 Unless states otherwise in the Examples, all recombinant techniques are carried out according to standard protocols as described in “Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York” and in “Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York”.

15 Standard materials and references are described in “Croy RDD (ed.) (1993) Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford” and in “Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 2nd Edition, Academic Press, San Diego”.Standard materials and methods for polymerase chain reactions (PCR) can be found in “McPherson MJ and Møller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford” and in “PCR  
20 Applications Manual, 3rd Edition (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim or www.roche-applied-science.com “

In the description and examples, reference is made to the following sequences:

- |    |               |                                                               |
|----|---------------|---------------------------------------------------------------|
| 25 | SEQ ID No. 1: | nucleotide sequence comprising a 5' flanking region of EE-GH5 |
|    | SEQ ID No. 2: | nucleotide sequence comprising a 3' flanking region of EE-GH5 |
|    | SEQ ID No. 3: | primer GHI057                                                 |
| 30 | SEQ ID No. 4: | primer MAE115                                                 |
|    | SEQ ID No. 5: | primer HVH022                                                 |
|    | SEQ ID No. 6: | primer GHI065                                                 |

|    |                |                                                                                                               |
|----|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | SEQ ID No. 7:  | primer HVH024                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 8:  | primer DPA312                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 9:  | primer GHI066                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 10: | primer GHI047                                                                                                 |
| 5  | SEQ ID No. 11: | primer GHI048                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 12: | Nucleotide sequence of the fragment amplified from<br>cotton DNA comprising EE-GH5 using GHI047 and<br>GHI048 |
|    | SEQ ID No. 13: | primer 1 for amplification of control fragment                                                                |
| 10 | SEQ ID No. 14: | primer 2 for amplification of control fragment                                                                |
|    | SEQ ID No. 15: | Nucleotide sequence of the plant genomic target<br>sequence prior to insertion of EE-GH5                      |
|    | SEQ ID No. 16: | Nucleotide sequence comprising a 5' flanking region<br>of EE-GH5 (long)                                       |
| 15 | SEQ ID No. 17: | primer HVH036                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 18: | primer SHA028                                                                                                 |
|    | SEQ ID No. 19: | primer MAE067                                                                                                 |

### Examples

#### **1. Identification of elite event EE-GH5**

5

Insect-resistant cotton was developed by transformation of cotton with a vector comprising the coding sequence of a modified crylab gene under the control of a Subterranean Clover stunt virus S7 promoter.

10 Elite event EE-GH5 was selected based on an extensive selection procedure based on good expression and stability of the insect resistance gene and its compatibility with optimal agronomic characteristics such as plant height, height to node, boll retention, stand, vigor, fiber length, fiber strength and lint yield were evaluated.

15 The selected event was introduced into different commercial genetic backgrounds, and results of field trials on different locations were compared. Plants were challenged with insect pests using different treatments. Plants exhibited good insect control.

Furthermore, the event had normal leaf, flower and boll morphology, excellent fertility,  
20 and showed no disease or abnormal insect susceptibility in multiple genetic backgrounds. During introgression into multiple genetic backgrounds no aberrant problems or abnormalities were observed.

#### **2. Identification of the flanking regions of elite event EE-GH5**

25

The sequence of the regions flanking the foreign DNA in the EE-GH5 elite event was determined using the thermal asymmetric interlaced (TAIL-) PCR method described by Liu et al. (1995, Plant J. 8(3):457-463) where possible. This method utilizes three nested primers in successive reactions together with a shorter arbitrary degenerate primer so  
30 that the relative amplification efficiencies of specific and non-specific products can be thermally controlled. The specific primers were selected for annealing to the border of the foreign DNA and based on their annealing conditions. A small amount (5µl) of

unpurified, secondary and tertiary, PCR products were analyzed on a 1% agarose gel. The tertiary PCR product was purified and sequenced.

#### 2.1. Right (5') flanking region

5

The fragment identified as comprising the 5' flanking region was sequenced (SEQ ID No. 1). The sequence between nucleotide 1 and 98 corresponds to plant DNA, while the sequence between nucleotide 99 and 334 corresponds to foreign DNA. A longer fragment comprising the 5' flanking region was also sequenced (SEQ ID No. 16). The  
10 sequence between nucleotide 1 and 563 corresponds to plant DNA, while the sequence between nucleotide 564 and 799 corresponds to foreign DNA

#### 2.2. Left (3') flanking region

15 The fragment identified as comprising the 3' flanking region obtained by the TAIL-PCR method was sequenced (SEQ ID No. 2). The sequence between nucleotide 1 and 40 corresponds to foreign DNA, while the sequence between nucleotide 41 and 452 corresponds to plant DNA.

#### 20 2.3. Region comprising EE-GH5 specific rearrangement in foreign DNA.

The nucleotide sequence of a region comprising the EE-GH5 specific rearrangement in the foreign DNA was identified (SEQ ID No. 12). The region between nucleotide positions 52 and 88 were identified as being rearranged when compared with the foreign  
25 DNA used to obtain transformants from which elite event EE-GH5 was selected.

### 3. Development of Polymerase Chain reaction identification protocols for EE-GH5

#### 30 3.1. Primers

Specific primers were developed which recognize sequences within the elite event.

More particularly, two primers were developed which recognize sequences flanking the EE-GH5 specific rearrangement in the foreign DNA. The primers span a sequence of about 262 bp. The following primers were found to give particularly clear and reproducible results in a PCR reaction on EE-GH5 DNA:

5

GHI047: 5'-TgC.CTC.TTg.AAC.TgT.AgC-3' (SEQ ID No.: 10)

GHI048: 5'-ACT.TgC.AgT.TgC.TgA.TgA.Tg-3' (SEQ ID No.: 11)

10 Alternatively, a primer was developed which recognizes a sequence within the 5' flanking region of EE-GH5. A second primer was then selected within the sequence of the foreign DNA so that the primers span a sequence of about 369 nucleotides. The following primers were found to give particularly clear and reproducible results in a PCR reaction on EE-GH5 DNA:

15

GHI065: 5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3' (SEQ ID No.: 6)  
(target: plant DNA)

GHI057: 5' - ATA.gCg.CgC.AAA.CTA.ggA-3' (SEQ ID No.: 3)  
(target: insert DNA)

20

Primers targeting an endogenous sequence are preferably included in the PCR cocktail. These primers serve as an internal control in unknown samples and in the DNA positive control. A positive result with the endogenous primer-pair demonstrates that there is  
25 ample DNA of adequate quality in the genomic DNA preparation for a PCR product to be generated. The endogenous primers were selected to recognize a housekeeping gene in cotton:

GHI001: 5'-AAC.CTA.ggC.TgC.TgA.Agg.AgC-3' (SEQ ID No.: 13)

30

GHI002: 5'-CAA.CTC.CTC.CAg.TCA.TCT.CCg-3' (SEQ ID No.: 14)

### 3.2. Amplified fragments

5 The expected amplified fragments in the PCR reaction are:

For primer pair GHI001-GHI002: 445bp (endogenous control)

For primer pair GHI047-GHI048: 262bp (EE-GH5 elite Event)

For primer pair GHI057-GHI065: 369bp (EE-GH5 elite Event)

10

### 3.3. Template DNA

Template DNA was prepared from a leaf punch according to Edwards *et al.* (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). When using DNA prepared with other methods, a test  
15 run utilizing different amounts of template should be done. Usually 50 ng of genomic template DNA yields the best results.

### 3.4. Assigned positive and negative controls

20 To avoid false positives or negatives, it was determined that the following positive and negative controls should be included in a PCR run:

- Master Mix control (DNA negative control). This is a PCR in which no DNA is added to the reaction. When the expected result, no PCR products, is observed this  
25 indicates that the PCR cocktail was not contaminated with target DNA.

- A DNA positive control (genomic DNA sample known to contain the transgenic sequences). Successful amplification of this positive control demonstrates that the PCR was run under conditions which allow for the amplification of target sequences.

30

- A wild-type DNA control. This is a PCR in which the template DNA provided is genomic DNA prepared from a non-transgenic plant. When the expected result, no

amplification of a transgene PCR product but amplification of the endogenous PCR product, is observed this indicates that there is no detectable transgene background amplification in a genomic DNA sample.

### 5 3.5. PCR conditions

**Optimal results were obtained under the following conditions:**

- the PCR mix for 25µl reactions contains:

10

2.5  $\mu$ l template DNA

**2.5 µl 10x Amplification Buffer (supplied by the manufacturer with the Taq polymerase)**

0.5  $\mu$ l 10 mM dNTP's

15

0.4  $\mu$ l GHI001 (10pmoles/ $\mu$ l)

0.4  $\mu$ l GHI002 (10pmoles/ $\mu$ l)

0.7  $\mu$ l GHI047 (10pmoles/ $\mu$ l) or GHI057 (PCR protocol 2)

0.7  $\mu$ l GHI048 (10pmoles/ $\mu$ l) or GHI065 (PCR protocol 2)

0.1  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5 units/ $\mu$ l)

20

water up to 25  $\mu$ l

- the thermocycling profile to be followed for optimal results is the following:

4 min. at 95°C

25

Followed by: 1 min. at 95°C

1 min. at 57°C

2 min. at 72°C

**For 5 cycles**

30

Followed by: 30 sec. at 92°C

30 sec. at 57°C

1 min. at 72°C

For 25 cycles

Followed by: 10 minutes at 72°C

5

### 3.6. Agarose gel analysis

To optimally visualise the results of the PCR it was determined that between 10 and 20µl of the PCR samples should be applied on a 1.5% agarose gel (Tris-borate buffer) with an appropriate molecular weight marker (e.g. 100bp ladder PHARMACIA).

10

### 3.7. Validation of the results

It was determined that data from transgenic plant DNA samples within a single PCR run and a single PCR cocktail should not be acceptable unless 1) the DNA positive control shows the expected PCR products (transgenic and endogenous fragments), 2) the DNA negative control is negative for PCR amplification (no fragments) and 3) the wild-type DNA control shows the expected result (endogenous fragment amplification).

15

When following the PCR Identification Protocol for EE-GH5 as described above, lanes showing visible amounts of the transgenic and endogenous PCR products of the expected sizes, indicate that the corresponding plant from which the genomic template DNA was prepared, has inherited the EE-GH5 elite event. Lanes not showing visible amounts of either of the transgenic PCR products and showing visible amounts of the endogenous PCR product, indicate that the corresponding plant from which the genomic template DNA was prepared, does not comprise the elite event. Lanes not showing visible amounts of the endogenous and transgenic PCR products, indicate that the quality and/or quantity of the genomic DNA didn't allow for a PCR product to be generated. These plants cannot be scored. The genomic DNA preparation should be repeated and a new PCR run, with the appropriate controls, has to be performed.

20

25

30

### 3.8. Use of discriminating PCR protocol to identify EE-GH5

Before attempting to screen unknowns, a test run, with all appropriate controls, has to be performed. The developed protocol might require optimization for components that may differ between labs (template DNA preparation, Taq DNA polymerase, quality of the primers, dNTP's, thermocycler, etc.).

Amplification of the endogenous sequence plays a key role in the protocol. One has to attain PCR and thermocycling conditions that amplify equimolar quantities of both the endogenous and transgenic sequence in a known transgenic genomic DNA template. Whenever the targeted endogenous fragment is not amplified or whenever the targeted sequences are not amplified with the same ethidium bromide staining intensities, as judged by agarose gel electrophoresis, optimization of the PCR conditions may be required.

Leaf material from a number of cotton plants, some of which comprising EE-GH5 were tested according to the above-described protocol. Samples from elite event EE-GH5 and from cotton wild-type were taken as positive and negative controls, respectively.

Figure 2 illustrates the result obtained with the elite event PCR identification protocol 1 for EE-GH5 on a number of cotton plant samples. The samples in lanes 2 to 3 were found to contain the elite event as the 305 bp band is detected, while the samples in lanes 4 to 10 do not comprise EE-GH5. Lanes 4 and 10 comprise other cotton elite events (including plants comprising different insect tolerance chimeric genes); lane 11 represents the negative control (water) sample, and lanes 1 and 12 represent the Molecular Weight Marker (100 bp ladder).

### 4. Use of a specific integration fragment as a probe for detection of material comprising EE-GH5

A specific integration fragment of EE-GH5 is obtained by PCR amplification using specific primers GHI047 (SEQ ID No. 10) and GHI048 (SEQ ID No. 11) or by chemical



GHI065      5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3'      (SEQ ID No.: 6)  
(target: plant DNA of the 3' flanking sequence)

5    5.2. Amplified fragments

The expected amplified fragments in the PCR reaction are:

- For primer pair GHI065 – GHI066: 517 bp (wild-type locus)  
10 For primer pair GHI057 – GHI065: 369 bp (EE-GH5 locus)

5.3. Template DNA

15 Template DNA was prepared from a leaf punch according to Edwards *et al.* (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). When using DNA prepared with other methods, a test run utilizing different amounts of template should be done. Usually 50 ng of genomic template DNA yields the best results.

20 5.4. Assigned positive and negative controls

To avoid false positives or negatives, it is advisable that the following positive and negative controls should be included in a PCR run:

- Master Mix control (DNA negative control). This is a PCR in which no DNA is  
25 added to the reaction. When the expected result, no PCR products, is observed this indicates that the PCR cocktail was not contaminated with target DNA.
- A DNA positive control (genomic DNA sample known to contain the transgenic  
30 sequences). Successful amplification of this positive control demonstrates that the PCR was run under conditions which allow for the amplification of target sequences.

- A wild-type DNA control. This is a PCR in which the template DNA provided is genomic DNA prepared from a non-transgenic plant. When the expected result, no amplification of a transgene PCR product but amplification of the endogenous PCR product, is observed this indicates that there is no detectable transgene background amplification in a genomic DNA sample.

#### 5.5. PCR conditions

Optimal results were obtained under the following conditions:

- the PCR mix for 25µl reactions contains:

x µl template DNA (150 ng)  
 2.5 µl 10x Amplification Buffer (supplied by the manufacturer with  
 the Taq polymerase)  
 0.5 µl 10 mM dNTP's  
 1.5 µl GHI053 (10pmoles/µl)  
 1.0 µl GHI054 (10pmoles/µl)  
 0.5 µl GHI041 (10pmoles/µl)  
 0.1 µl Taq DNA polymerase (5 units/µl)  
 water up to 25 µl

- the thermocycling profile to be followed for optimal results is the following:

4 min. at 95°C

Followed by: 1 min. at 95°C  
 1 min. at 57°C  
 2 min. at 72°C  
 For 5 cycles

Followed by: 30 sec. at 92°C

30 sec. at 57°C

1 min. at 72°C

For 25 cycles

5 Followed by: 10 minutes at 72°C

#### 5.6. Agarose gel analysis

10 To optimally visualise the results of the PCR it was determined that between 10 and 20µl of the PCR samples should be applied on a 1.5% agarose gel (Tris-borate buffer) with an appropriate molecular weight marker (e.g. 100bp ladder PHARMACIA).

#### 5.7. Validation of the results

15 Data from transgenic plant DNA samples within a single PCR run and a single PCR Master Mix will not be acceptable unless:

- the positive control shows the expected PCR products (transgenic target amplification)
- the wild-type-positive DNA control shows the expected result (wild-type target amplification).
- 20 - the negative control is negative for PCR amplification (no fragments).

Lanes showing visible amounts of the transgenic PCR product of the expected size and not showing visible amounts of the wild type PCR product, indicate that the  
25 corresponding plant from which the genomic DNA template was prepared, is homozygous for the transgenic gene cassette.

Lanes showing visible amounts of the transgenic and wild type PCR products of the expected sizes, indicate that the corresponding plant from which the genomic template  
30 DNA was prepared, is hemizygous for the transgenic gene cassette. Lanes not showing visible amounts of the transgenic PCR product and showing visible amounts of the wild type PCR product, indicate that the corresponding plant from which the genomic

template DNA was prepared, has not inherited the transgenic sequence assayed for and is thus homozygous for the wild type locus.

5 Lanes not showing visible amounts of transgenic and wild type PCR products, indicate that the quality and/or quantity of the genomic DNA didn't allow for a PCR product to be generated. These plants cannot be scored. The genomic DNA preparation should be repeated and a new PCR run, with the appropriate controls, has to be performed.

10 5.8. Use of the zygosity scoring protocol for identification of zygosity status in EE-GH5 containing plants.

Figure 3 illustrates the result obtained with the zygosity scoring PCR for EE-GH5 on a number of cotton plant samples. The samples in lanes 2-3 and 6-7 were found to contain the PCR fragment (369 bp) characteristic for elite event EE-GH5, while the samples in 15 lanes 2, 3 and 5 contained the fragment characteristic for the presence of the wt locus. Lanes 6 and 7 therefore contain EE-GH5 in homozygous form, lanes 2 and 3 contain EE-GH5 in hemizygous form and lane 5 contains the wt locus in homozygous form (azygous for EE-GH5). Lane 8 represents the negative control (water) sample, and lanes 1 and 9 represent the Molecular Weight Marker (100 bp ladder).

20

## 6. Introgression of EE-GH5 into preferred cultivars

Elite event EE-GH5 is introduced by repeated back-crossing into commercial cotton cultivars such as but not limited to FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, 25 FM966 and FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044, FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 or FM5024.

It is observed that the introgression of the elite event into these cultivars does not significantly influence any of the desirable phenotypic or agronomic characteristics of 30 these cultivars (no linkage drag) while expression of the transgene, as determined by glufosinate tolerance, meets commercially acceptable levels. This confirms the status of event EE-GH5 as an elite event.

Elite event may be advantageously combined with other elite events available in the market, particularly other elite event insect resistance gene for the purpose of insect resistance management, such as but not limited to event 3006-210-23; (USDA aphs  
5 petition 03-036-02p) event 281-24-236 (USDA aphs petition 03-036-01p); event MON158985 (USDA aphs petition 00-342-01p); event MON531 (USDA aphs petition 94-308-01p) or event COT102 (=Syngenta vip3A) USDA aphs petition 03-155-01p. Elite event EE\_GH5 can also be combined with herbice tolerant elite events such as event MON1445 (USDA aphs petition 95-045-01p) or event MON88913 (USDA aphs  
10 petittion 04-086-01p).

As used in the claims below, unless otherwise clearly indicated, the term “plant” is intended to encompass plant tissues, at any stage of maturity, as well as any cells, tissues, or organs taken from or derived from any such plant, including without  
15 limitation, any seeds, leaves, stems, flowers, roots, single cells, gametes, cell cultures, tissue cultures or protoplasts.

Reference seed comprising elite event EE-GH5 was deposited as EE-GH5 at the ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) on January 22, 2007, under ATCC  
20 accession number PTA-8171. An alternative name for EE-GH5 is T304-40

As used in the claims below, unless otherwise clearly indicated, the term “plant” is intended to encompass plant tissues, at any stage of maturity, as well as any cells, tissues, or organs taken from or derived from any such plant, including without  
25 limitation, any seeds, leaves, stems, flowers, roots, single cells, gametes, cell cultures, tissue cultures or protoplasts.

The above description of the invention is intended to be illustrative and not limiting.

30 Various changes or modifications in the embodiments described may occur to those skilled in the art. These can be made without departing from the spirit or scope of the invention.

Claims

1. A transgenic cotton plant, or cells, parts, seed or progeny thereof, each comprising elite event EE-GH5 in its genome, reference seed comprising said event having  
5 being deposited at the ATCC under deposit number PTA-8171.
2. The transgenic cotton plant, seed, cells, parts or progeny of claim 1, the genomic DNA of which, when analyzed using the Elite event indentification protocol for EE-GH5 with two primers comprising the nucleotide sequence of SEQ ID 10 and  
10 SEQ ID 11 respectively, yields a DNA fragment of about 262 bp or when analyzed using the Elite event indentification protocol for EE-GH5 with two primers comprising the nucleotide sequence of SEQ ID 3 and SEQ ID 6 respectively, yields a DNA fragment of about 369 bp.
- 15 3. Seed comprising elite event EE-GH5 deposited at the ATCC under deposit number PTA-8171 or derivatives therefrom.
4. A cotton plant or a part thereof, or seed therefrom obtained from the seed of claim 3.
- 20 5. A cotton plant, or seed, cells or tissues thereof, each comprising elite event EE-GH5 in its genome, obtained by propagation of and/or breeding with a cotton plant grown from the seed deposited at the ATCC under deposit number PTA-8171.
- 25 6. A cotton seed comprising elite event EE-GH5, reference seed comprising said event having been deposited at the ATCC under deposit number PTA-8171.
7. A transgenic cotton plant, cell or tissue, comprising elite event EE-GH5, produced from the seed of claim 6.

30

8. A method for producing a cotton plant or seed comprising elite event EE-GH5 comprising crossing a plant according to any one of claims 1 to 7 with another cotton plant, and planting the seed obtained from said cross.
- 5 9. Cotton genomic DNA comprising elite event EE-GH5
10. Genomic DNA produced from a cotton plant, plant cell or seed according to any one of claims 1 to 7.
- 10 11. A method for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, which method comprises detection of an EE-GH5 specific region with a specific primer or probe which specifically recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5.
12. The method of claim 11, said method comprising amplifying a DNA fragment of  
15 between 100 and 500 bp from a nucleic acid present in said biological samples using a polymerase chain reaction with at least two primers, one of said primers recognizing the 5' flanking region of EE-GH5, said 5' flanking region having the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or the  
20 3' flanking region of EE-GH5, said 3' flanking region having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452, the other primer of said primers recognizing a sequence within the foreign DNA having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from  
25 nucleotide 1 to nucleotide 40.
13. The method of claim 12, wherein said primer recognizing the 5' flanking region consist of a nucleotide sequence of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98  
30 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or said primer recognizing the 3' flanking region of EE-GH5 consist of a nucleotide sequence of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the

nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452, and said primer recognizing a sequence within the foreign DNA consists of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

14. The method of claim 2, wherein said primer recognizing the 5' flanking region comprises at its extreme 3' end a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or said primer recognizing the 3' flanking region of EE-GH5 comprises at its extreme 3' end a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452, and said primer recognizing a sequence within the foreign DNA comprises at its 3' end at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

20

15. The method of claim 4, wherein said primers comprise the sequence of SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 6, respectively.

16. The method of claim 5, which method comprises amplifying a fragment of about 369 bp using the EE-GH5 identification protocol.

25

17. A kit for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, said kit comprising one primer recognizing the 5' flanking region of EE-GH5, said 5' flanking region having the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or one primer recognizing the 3' flanking region of EE-GH5, said 3' flanking region having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from

30

nucleotide 41 to nucleotide 452, and one primer recognizing a sequence within the foreign DNA, said foreign DNA having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

5

18. The kit of claim 17, wherein said primer recognizing the 5' flanking region consist of a nucleotide sequence of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or said primer recognizing the 3' flanking region of EE-GH5 consist of a nucleotide sequence of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452, and said primer recognizing a sequence within the foreign DNA consists of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

10

15

19. The kit of claim 17, wherein said primer recognizing the 5' flanking region comprises at its extreme 3' end a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or said primer recognizing the 3' flanking region of EE-GH5 comprises at its extreme 3' end a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452, and said primer recognizing a sequence within the foreign DNA comprises at its 3' end at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1 from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

20

25

30

20. The kit of claim 17, comprising a primer consisting of the sequence of SEQ ID No. 3 and a primer consisting of the sequence of SEQ ID No. 6.

21. A primer suitable for use in an EE-GH5 specific detection, having a sequence which, under optimized detection conditions specifically recognizes a sequence within the 5' or 3' flanking region of EE-GH5, said 5' flanking region having the  
5 nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 and said 3' flanking region having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452.
- 10 22. The primer of claim 21, wherein said primer consists of a nucleotide sequence of 17 to 200 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or a nucleotide sequence of 17 to 200  
15 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452.
23. The primer of claim 21, wherein said primer comprises at its extreme 3' end a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the  
20 nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563 or a nucleotide sequence of at least 17 consecutive nucleotides selected from the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452.
- 25 24. A primer comprising at its extreme 3' end the sequence of SEQ ID No. 3.
25. A primer comprising at its extreme 3' end the sequence of SEQ ID No. 6.
26. The method of claim 11, which method comprises hybridizing a nucleic acid of  
30 biological samples with a specific probe for EE-GH5.

27. The method of claim 26, wherein the sequence of said specific probe has at least 80% sequence identity with a sequence comprising part of the 5' flanking sequence or the 3' flanking sequence of EE-GH5 and the sequence of the foreign DNA contiguous therewith.
- 5
28. The method of claim 27, wherein the sequence of said specific probe has at least 80% sequence identity with SEQ ID No. 1 from nucleotide 78 to 119 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 61, or the complement of said sequences.
- 10
29. A kit for identifying elite event EE-GH5 in biological samples, said kit comprising a specific probe, capable of hybridizing specifically to a specific region of EE-GH5.
- 15
30. The kit of claim 29, wherein the sequence of said specific probe has at least 80% sequence identity with a sequence comprising part of the 5' flanking sequence or the 3' flanking sequence of EE-GH5 and the sequence of the foreign DNA contiguous therewith.
- 20
31. The kit of claim 30, wherein the sequence of said specific probe has at least 80% sequence identity with SEQ ID No. 1 SEQ ID No. 1 from nucleotide 78 to 119 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 61, or the complement of said sequences.
- 25
32. A specific probe for the identification of elite event EE-GH5 in biological samples.
- 30
33. The probe of claim 32, which has at least 80% sequence identity with a sequence comprising part of the 5' flanking sequence or the 3' flanking sequence of EE-GH5 and the sequence of the foreign DNA contiguous therewith, or the complement thereof.

34. The probe of claim 33, which has at least 80% sequence identity with SEQ ID No. 1 from nucleotide 78 to 119 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 61, or the complement of said sequences.
- 5 35. A specific probe for the identification of elite event EE-GH5 in biological samples, the sequence of being essentially similar to SEQ ID No. 1 from nucleotide 78 to 119 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 61, or the complement of said sequences.
- 10 36. A method for confirming seed purity, which method comprises detection of an EE-GH5 specific region with a specific primer or probe which specifically recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5, in seed samples.
- 15 37. A method for screening seeds for the presence of EE-GH5, which method comprises detection of an EE-GH5 specific region with a specific primer or probe which specifically recognizes the 5' or 3' flanking region of EE-GH5, in samples of seed lots.
- 20 38. A method for determining the zygosity status of a plant, plant material or seed comprising elite event EE-GH5, said method comprising amplifying DNA fragments of between 100 and 500 bp from a nucleic acid present in said biological samples using a polymerase chain reaction with at least three primers, two of said primers specifically recognizing pre-insertion plant DNA, such as the 5' flanking region of EE-GH5, said 5' flanking region having the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 1 to nucleotide 98 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 16 from nucleotide 1 to nucleotide 563, or the 3' flanking region of EE-GH5, said 3' flanking region having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 452 or the pre-insertion DNA having the nucleotide sequence of SEQ ID No 15 or the complement thereof, the third of said primers recognizing a sequence within the foreign DNA having the nucleotide sequence of the complement of SEQ ID No. 1
- 25
- 30

from nucleotide 99 to nucleotide 334 or the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 1 to nucleotide 40.

39. The method according to claim 38, wherein said first primers comprises the nucleotide sequence of SEQ ID No 6, said second primer comprises the sequence of SEQ ID No 9 and said third primer comprises the sequence of SEQ ID No 3.

40. A method of detecting the presence of elite event EE-GH5 in biological samples through hybridization with a substantially complementary labeled nucleic acid probe in which the probe:target nucleic acid ratio is amplified through recycling of the target nucleic acid sequence, said method comprising:

a) hybridizing said target nucleic acid sequence to a first nucleic acid oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 99 to nucleotide 116 or its complement or said first nucleic acid oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 23 to nucleotide 40 or its complement;

b) hybridizing said target nucleic acid sequence to a second nucleic acid oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 1 from nucleotide 81 to nucleotide 98 or its complement or said labeled nucleic acid probe comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 2 from nucleotide 41 to nucleotide 58 or its complement, wherein said first and second oligonucleotide overlap by at least one nucleotide and wherein either said first or said second oligonucleotide is labeled to be said labeled nucleic acid probe;

c) cleaving only the labeled probe within the probe:target nucleic acid sequence duplex with an enzyme which causes selective probe cleavage resulting in duplex disassociation, leaving the target sequence intact;

d) recycling of the target nucleic acid sequence by repeating steps (a) to (c); and

e) detecting cleaved labeled probe, thereby determining the presence of said target nucleic acid sequence.

41. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence essentially similar to SEQ ID No. 1 from nucleotide 88 to nucleotide 109 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 30 to 50, or the complement of said sequences.
- 5 42. The isolated nucleic acid molecule of claim 41 comprising a nucleotide sequence essentially similar to SEQ ID No. 1 from nucleotide 78 to nucleotide 119 or SEQ ID No. 2 from nucleotide 20 to 60, or the complement of said sequences.
- 10 43. An isolated nucleic acid fragment comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No. 12
44. The method of claim 11, comprising amplifying a DNA fragment of about 262 bp using primers consisting essentially of the nucleotides sequences of SEQ ID No 10 and SEQ ID No 11 respectively.
- 15 45. A kit comprising two oligonucleotide primers consisting essentially of the nucleotides sequences of SEQ ID No 10 and SEQ ID No 11 respectively.

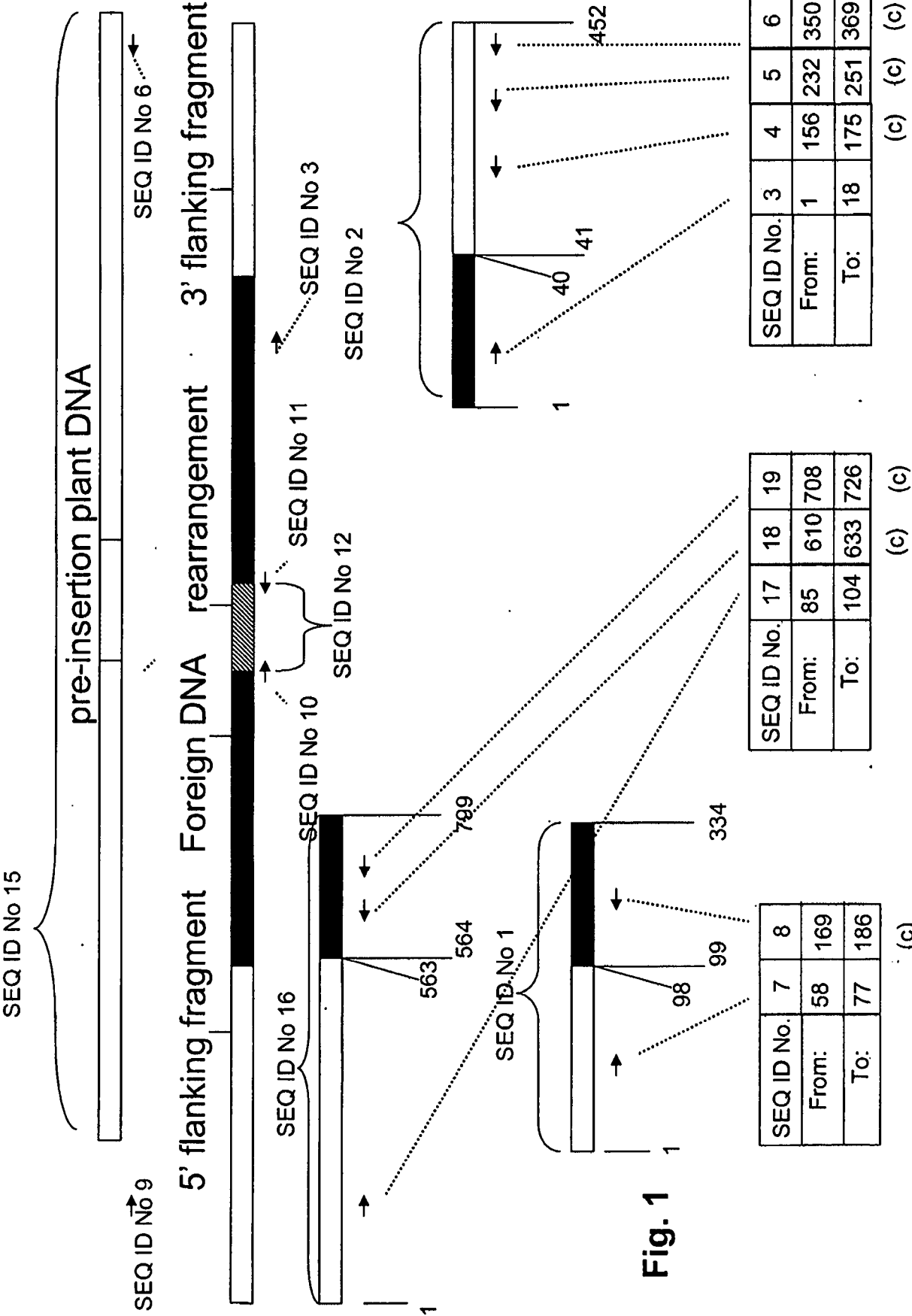


Fig. 2

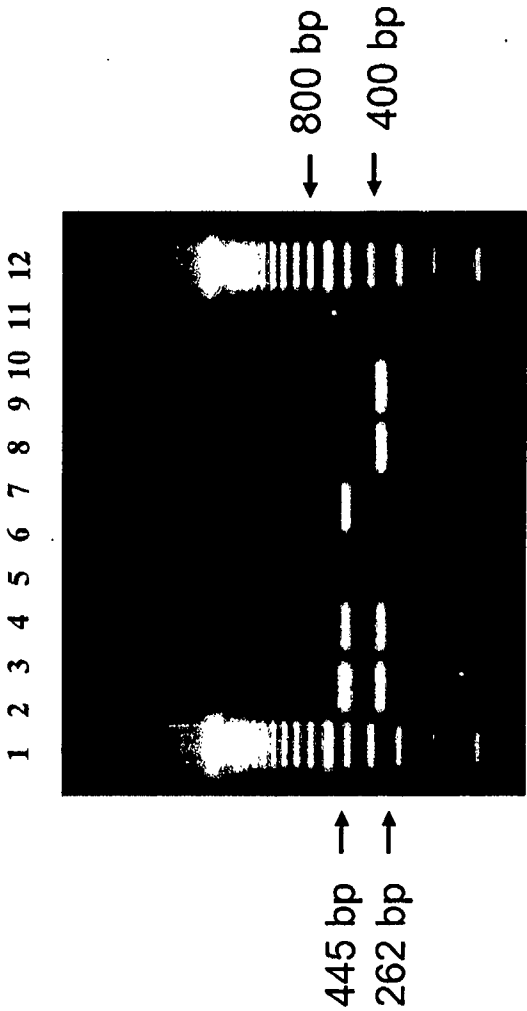
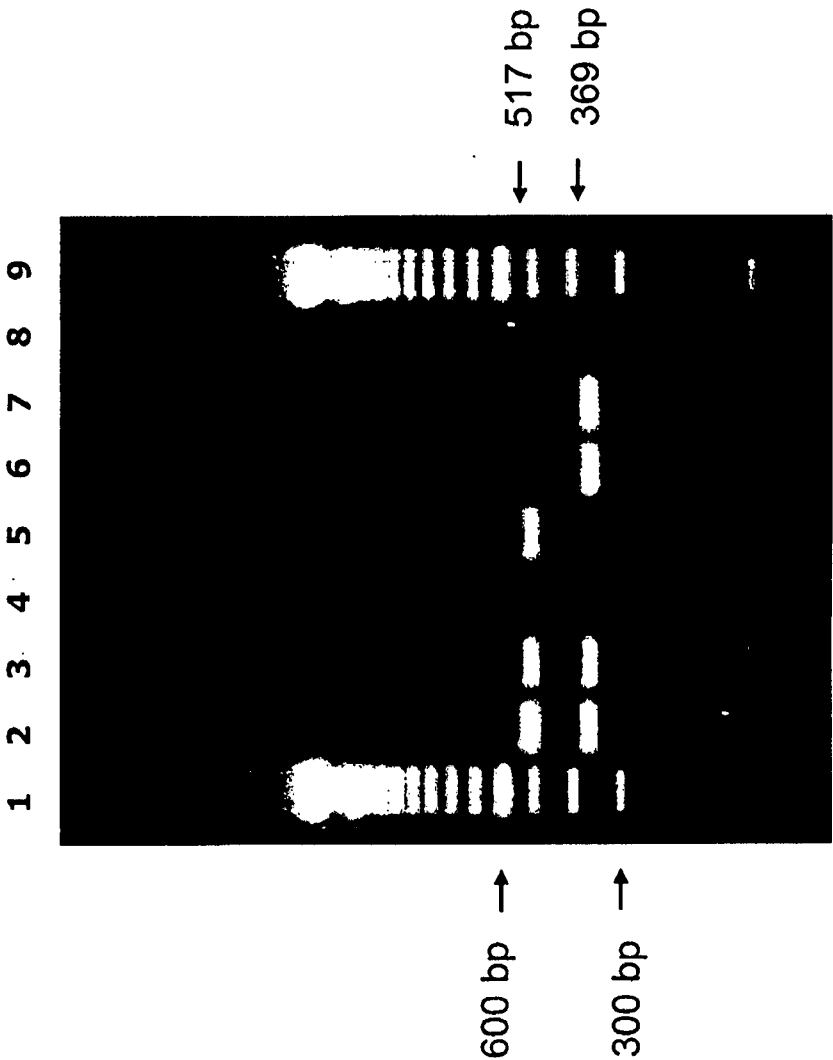


Fig. 3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/002667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2006/128572 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; CAYLEY PATRICIA JANE [GB]; NEGROTTI D) 7 December 2006 (2006-12-07) examples 2,4 | 10, 29, 32            |
| Y         | the whole document                                                                                                                  | 1-45                  |
| X         | WO 2006/128573 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; CAYLEY PATRICIA JANE [GB]; NEGROTTI D) 7 December 2006 (2006-12-07) examples 2,4 | 10, 29, 32            |
| X         | WO 2006/128568 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; CAYLEY PATRICIA JANE [GB]; NEGROTTI D) 7 December 2006 (2006-12-07) examples 2,4 | 10, 29, 32            |
|           | -----<br>-/--                                                                                                                       |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 August 2008

Date of mailing of the international search report

20/08/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651-epo-nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, Alexander

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/002667

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2006/128571 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; CAYLEY PATRICIA JANE [GB]; NEGROTTO D) 7 December 2006 (2006-12-07) examples 2,4                                                                                                                                                                                                | 10, 29, 32            |
| X         | WO 98/31822 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV [BE]; KARIMI MANSOUR [BE]; BARTHELS NATHALIE) 23 July 1998 (1998-07-23) sequence 9                                                                                                                                                                                                         | 35, 41, 42            |
| X         | WO 03/008440 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; LEVIN JOSHUA ZVI [US]; PATTON DAVID A) 30 January 2003 (2003-01-30) sequence 120                                                                                                                                                                                                  | 35, 41, 42            |
| X         | WO 2004/078966 A (MEIJI SEIKA KAISHA [JP]; NAKAMURA HIROFUMI [JP]; KUBOTA HIDETOSHI [JP]) 16 September 2004 (2004-09-16) sequence 3                                                                                                                                                                                                | 24                    |
| X         | WO 2004/048511 A (ROSETTA GENOMICS LTD [IL]; BENTWICH ITZHAK [IL]) 10 June 2004 (2004-06-10) sequence 159810                                                                                                                                                                                                                       | 21                    |
| Y         | WO 03/093484 A (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]) 13 November 2003 (2003-11-13) cited in the application example 3                                                                                                                                                                                                                         | 1-45                  |
| Y         | PERLAK F J ET AL: "INSECT RESISTANT COTTON PLANTS" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 8, no. 10, 1 October 1990 (1990-10-01), pages 939-943, XP002026582 ISSN: 0733-222X the whole document                                                                                                                  | 1-45                  |
| A         | WO 03/013224 A (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]) 20 February 2003 (2003-02-20) the whole document                                                                                                                                                                                                                                         | 1-45                  |
| A         | PARKER C D ET AL: "SURVIVAL RATES OF TOBACCO BUDWORM (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) LARVAE EXPOSED TO TRANSGENIC COTTONS EXPRESSING INSECTICIDAL PROTEIN OF BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER" JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SCIENCE, GRIFFIN, GA, US, vol. 35, no. 2, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 105-117, XP008068316 the whole document | 1-45                  |
|           | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/002667

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | <p>CHOI YOUNG IM ET AL: "Adaptor-aided PCR to identify T-DNA junctions in transgenic plants"<br/> BIOTECHNIQUES, INFORMA LIFE SCIENCES PUBLISHING, WESTBOROUGH, MA, US,<br/> vol. 27, no. 2,<br/> 1 August 1999 (1999-08-01), pages 222-226,<br/> XP002236502<br/> ISSN: 0736-6205<br/> the whole document</p>                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-45                  |
| A         | <p>WINDELS P ET AL: "DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD A CASE STUDY"<br/> MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN UNIVERSITEITGENT, GENT, BE,<br/> vol. 64, no. 5B,<br/> 22 September 1999 (1999-09-22), pages 459-462, XP001032975<br/> ISSN: 0368-9697<br/> the whole document</p>                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-45                  |
| A         | <p>ANONYMOUS: "Deliberate release into the E.U. environment of GMOs for any other purposes than placing on the market: Field trials with insect resistance and glufosinate ammonium herbicide tolerant cotton transformation event T304-40"<br/> SEEDQUEST, [Online]<br/> 24 February 2006 (2006-02-24), XP002491064<br/> Retrieved from the Internet:<br/> URL: <a href="http://www.seedquest.com/News/releases/2006/february/15010.htm">http://www.seedquest.com/News/releases/2006/february/15010.htm</a><br/> [retrieved on 2008-08-04]<br/> the whole document</p> | 1-45                  |
| A         | <p>ANONYMOUS: "Experimental Use Permit; Receipt of Application; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY [EPA-HQ-OPP-2006-0349; FRL-8105-7]"<br/> FEDERAL REGISTER ONLINE, [Online]<br/> vol. 72, no. 10,<br/> 17 January 2007 (2007-01-17), XP002491065<br/> Retrieved from the Internet:<br/> URL: <a href="http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2007/January/Day-17/p550.htm">http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2007/January/Day-17/p550.htm</a><br/> [retrieved on 2008-08-04]<br/> the whole document</p>                                                                | 1-45                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/002667

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/002667

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2006128572 A                           | 07-12-2006          | AR 053503 A1               | 09-05-2007          |
| WO 2006128573 A                           | 07-12-2006          | AR 053501 A1               | 09-05-2007          |
|                                           |                     | AU 2006254493 A1           | 07-12-2006          |
|                                           |                     | EP 1917359 A2              | 07-05-2008          |
| WO 2006128568 A                           | 07-12-2006          | AR 053504 A1               | 09-05-2007          |
| WO 2006128571 A                           | 07-12-2006          | AR 053502 A1               | 09-05-2007          |
|                                           |                     | AU 2006254491 A1           | 07-12-2006          |
|                                           |                     | EP 1917358 A2              | 07-05-2008          |
| WO 9831822 A                              | 23-07-1998          | AU 720780 B2               | 15-06-2000          |
|                                           |                     | AU 6615798 A               | 07-08-1998          |
|                                           |                     | BR 9807488 A               | 21-03-2000          |
|                                           |                     | CA 2275491 A1              | 23-07-1998          |
|                                           |                     | HU 0000922 A2              | 28-08-2000          |
|                                           |                     | JP 2001508661 T            | 03-07-2001          |
|                                           |                     | US 6252138 B1              | 26-06-2001          |
| WO 03008440 A                             | 30-01-2003          | AU 2002328909 A1           | 03-03-2003          |
| WO 2004078966 A                           | 16-09-2004          | BR PI0408000 A             | 14-02-2006          |
|                                           |                     | CA 2518400 A1              | 16-09-2004          |
|                                           |                     | EP 1600509 A1              | 30-11-2005          |
|                                           |                     | US 2006156436 A1           | 13-07-2006          |
| WO 2004048511 A                           | 10-06-2004          | AU 2003302409 A1           | 18-06-2004          |
|                                           |                     | EP 1576145 A2              | 21-09-2005          |
|                                           |                     | US 2007031823 A1           | 08-02-2007          |
| WO 03093484 A                             | 13-11-2003          | AU 2003229776 A1           | 17-11-2003          |
|                                           |                     | BR 0309865 A               | 29-03-2005          |
|                                           |                     | CN 1650018 A               | 03-08-2005          |
|                                           |                     | EP 1504104 A1              | 09-02-2005          |
|                                           |                     | MX PA04010770 A            | 07-03-2005          |
|                                           |                     | US 2003208790 A1           | 06-11-2003          |
|                                           |                     | ZA 200408707 A             | 18-11-2005          |
| WO 03013224 A                             | 20-02-2003          | BR 0211726 A               | 21-09-2004          |
|                                           |                     | CN 1551920 A               | 01-12-2004          |
|                                           |                     | EP 1417312 A2              | 12-05-2004          |
|                                           |                     | MX PA04001108 A            | 17-02-2005          |
|                                           |                     | US 2005005334 A1           | 06-01-2005          |
|                                           |                     | US 2003097687 A1           | 22-05-2003          |
|                                           |                     | ZA 200400644 A             | 27-01-2005          |

**PLANTAS DE ALGODÓN CON TOLERANCIA A INSECTOS Y MÉTODOS PARA IDENTIFICARLAS**

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con plantas, material vegetal y semillas de algodón transgénicas, caracterizadas porque contienen un evento de transformación específico, en particular por la presencia de un gen que codifica una proteína que confiere tolerancia a insectos, en una localización específica del genoma del algodón. Las plantas de algodón de la invención combinan el fenotipo de tolerancia a insectos con el rendimiento agronómico, estabilidad genética y adaptabilidad a distintos antecedentes genéticos equivalentes a la línea de algodón no transformada, en ausencia de insectos. Además, en esta invención se proveen métodos y conjuntos de elementos para identificar la presencia de material vegetal que comprende específicamente el evento de transformación EE-GH5 en muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

La expresión fenotípica de un transgen en una planta está determinada por la estructura del gen mismo y por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgen (en un ADN extraño) en distintas localizaciones en el genoma afectará al fenotipo general de la planta de distintos modos. La introducción exitosa, desde el punto de vista agronómico o industrial, de un carácter de interés comercial en una planta, por medio de manipulación genética, puede ser un procedimiento prolongado que depende de distintos factores. La transformación y la regeneración real de plantas transformadas genéticamente son solamente los primeros pasos en una serie de pasos de selección, que incluyen una extensiva caracterización genética, cruzamiento y evaluación en pruebas de campo, lo que eventualmente conduce a la selección de un evento elite.

La fibra de algodón es el producto textil más importante a nivel mundial. Cada año se cosechan aproximadamente 80 millones de acres de algodón en todo el mundo.

El algodón es el quinto cultivo más grande en los EE.UU. en términos de producción por extensión en acres, con más de 15 millones de acres plantados en 2000.

Las especies de insectos más dañinas que se alimentan del algodón son *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca de maíz o gusano del algodón), *Helicoverpa armigera* (oruga de los copos americano) *Heliothis virescens* (oruga de los brotes de tabaco) y *Helicoverpa punctigera*.

La identificación inequívoca de un evento elite tiene una importancia creciente en virtud de las discusiones sobre Alimentos/Pienso Novedosos, segregación de productos GMO y distintos de GMO, y la identificación de material registrado. Idealmente, este método de identificación es rápido y simple, sin la necesidad de una instalación de laboratorio extensiva. Además, el método debería proporcionar resultados que permitieran determinar de manera inequívoca el evento elite sin la interpretación de expertos, pero que aún pudiera satisfacer el escrutinio de un experto, si fuera necesario. En la presente se describen herramientas específicas de utilidad para la identificación del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas.

El evento EE-GH5 ha sido identificado como un evento elite de una población de plantas de algodón transgénico en el desarrollo de algodón resistente a insectos (*Gossypium hirsutum*) que comprende un gen que codifica una proteína cristalina insecticida de *Bacillus thuringiensis*. Las plantas de algodón transgénico contienen un gen quimérico que codifica una proteína cristalina insecticida Bt (según se describe en WO03/093484) bajo el control de un promotor que se expresa en plantas.

En la técnica se han revelado plantas de algodón que comprenden un gen de tolerancia a insectos. Sin embargo, en ninguna de las revelaciones de la técnica anterior se detalla o sugiere la presente invención.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con una planta de algodón transgénico, o semillas, células o tejidos de la misma, que comprende, integrado de forma estable en

su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de resistencia a insectos que comprende la secuencia codificante del gen cry1Ab (descrita en el Ejemplo 1.1 en la presente), que es resistente a insectos y, en ausencia de presión por insectos, que tiene un rendimiento agronómico que es sustancialmente equivalente a la línea isogénica no transgénica. Bajo la presión por insectos, la planta mostrará un fenotipo agronómico superior en comparación con la planta no transgénica.

De acuerdo con la presente invención, la planta de algodón, o semillas, células o tejidos de la misma, comprende al evento elite EE-GH5.

Más específicamente, la presente invención se relaciona con una planta de algodón transgénica, con semillas, células o tejidos de la misma, cuyo ADN genómico se caracteriza por el hecho de que, cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR como se describe en la presente, usando dos cebadores dirigidos a la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, y el ADN extraño, respectivamente, provee un fragmento que es específico para EE-GH5. Los cebadores pueden ser dirigidos contra la región flanqueadora 5' dentro de la SEQ ID N° 1 y el ADN extraño, respectivamente, tales como los cebadores que comprenden o consisten de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 7 y la SEQ ID N° 8, respectivamente, y permiten obtener un fragmento de ADN de entre 100 y 700 bp, preferentemente de aproximadamente 129 bp. Los cebadores también pueden ser dirigidos contra la región flanqueadora 3' dentro de la SEQ ID N° 2 y el ADN extraño, respectivamente, tales como los cebadores que comprenden o consisten de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 y la SEQ ID N° 6, respectivamente, y permiten obtener un fragmento de ADN de entre 300 y 700 bp, preferentemente de aproximadamente 369 bp.

Las semillas de referencia que comprenden al evento elite de la invención fueron depositadas en ATCC con el N° de acceso PTA-8171. Una realización de la invención es la semilla que comprende al evento elite EE-GH5 depositado en ATTC con el N° de acceso PTA-8171, que crecerá en una planta de algodón resistente a insectos, en parti-

cular *Helicoverpa sp.* o *Heliothis sp.* Las semillas de ATCC con el N° de depósito PTA-8171, comprenden un lote de semillas que consiste de al menos un 95% aproximadamente de granos transgénicos homocigotas para el transgen, que comprenden al evento elite de la invención, que crecerán en plantas resistentes a insectos, con lo cual las plantas también son plantas tolerantes a glufosinato. Las semillas se pueden sembrar y las plantas en crecimiento pueden ser tratadas con glufosinato como se describe en la presente para obtener un 100% de plantas tolerantes a glufosinato, que comprenden al evento elite de la invención. Además, la invención se relaciona con células, tejidos, progenie y descendientes de una planta que comprende el evento elite de la invención, cultivadas a partir de la semilla depositada en la ATCC con el N° de acceso PTA-8171. Además, la invención se relaciona con plantas que se pueden obtener mediante propagación y/o cruzamiento con una planta de algodón que comprende el evento elite de la invención, cultivadas a partir de la semilla depositada en la ATCC con el N° de acceso PTA-8171.

La invención también se relaciona con plantas de algodón que comprenden al evento elite EE-GH5.

Además, la invención se relaciona con un método para identificar una planta transgénica, o células o tejidos de la misma, que comprende el evento elite EE-GH5, donde el método se basa en identificar la presencia de secuencias de ADN características, o de aminoácidos codificados por dichas secuencias de ADN, en la planta, las células o los tejidos transgénicos. De acuerdo con una realización preferida de la invención, estas secuencias de ADN son secuencias de 15 bp, preferentemente 20 bp, más preferentemente 30 bp o más, que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir, una parte de ADN extraño y una parte del genoma de algodón (la región flanqueadora 5' o 3') contigua al mismo, lo que permite la identificación del evento elite.

Además, la presente invención se relaciona con métodos para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde los métodos se basan en cebadores o

sondas que reconocen específicamente la secuencia flanqueadora 5' y/o 3' de EE-GH5.

Más específicamente, la invención se relaciona con un método que comprende ampliar una secuencia de un ácido nucleico presente en muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, y el otro reconoce una secuencia dentro del ADN extraño, preferentemente para obtener un fragmento de ADN de entre 100 y 500 bp. Los cebadores pueden reconocer una secuencia dentro de la región flanqueadora 5' de EE-GH5 (SEQ ID N° 1, desde la posición 1 hasta la posición 98 o SEQ ID N° 16 desde la posición 1 a 563) o dentro de la región flanqueadora 3' de EE-GH5 (complemento de la SEQ ID N° 2 desde la posición 41 hasta la posición 452) y una secuencia dentro del ADN extraño (complemento de la SEQ ID N° 1 desde la posición 99 hasta 334 o la SEQ ID N° 2 desde la posición 1 hasta la posición 40), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueadora 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 7 o de la SEQ ID N° 17 y el cebador que reconoce la secuencia dentro del ADN extraño puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 8, la SEQ ID N° 18 o la SEQ ID N° 19, descritas en la presente. El cebador que reconoce la región flanqueadora 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 6, y el cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 descrita en la presente.

Más específicamente, la presente invención se relaciona con un método para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde el método comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 y de la SEQ ID N° 6, respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 369 bp.

El evento elite actual comprende una secuencia de ADN extraño en donde ha te-

nido lugar un ligero reordenamiento cuando se la compara con el ADN usado inicialmente para el procedimiento de transformación, siendo dicho reordenamiento único para el evento elite EE-GH5. Por consiguiente, la invención también se relaciona con un método para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde dicho método comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que flanquean el reordenamiento único de ADN extraño en EE-GH5, tales como los cebadores que comprenden o tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 10 y la SEQ ID N° 11, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 262 bp.

Además, la presente invención se relaciona con las secuencias flanqueadoras específicas de EE-GH5 descritas en la presente, que se pueden usar para desarrollar métodos de identificación específicos de EE-GH5 en muestras biológicas. Dichas secuencias flanqueadoras específicas también se pueden usar como material de control de referencia en ensayos de identificación. Más particularmente, la invención se relaciona con las regiones flanqueadoras 5' y/o 3' de EE-GH5, que se pueden usar para desarrollar cebadores y sondas específicas, como se describe además en la presente. La invención también se relaciona con moléculas de ácido nucleico que abarcan los reordenamientos específicos dentro del ADN extraño de EE-GH5, tal como una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID N° 12 desde la posición de nucleótido 52 hasta la posición de nucleótido 88, o que comprende la secuencia de la SEQ ID N°:12. También son adecuadas como material de referencia las moléculas de ácido nucleico, preferentemente de aproximadamente 369 bp, que comprenden la secuencia que puede ser amplificada por cebadores que presentan la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 y la SEQ ID N° 6

Además, la invención se relaciona con métodos para identificar la presencia de EE-GH5 en muestras biológicas, basado en el uso de estos cebadores o estas sondas específicas. Los cebadores pueden consistir de una secuencia de nucleótidos que com-

prende entre 17 y 200 nucleótidos consecutivos aproximadamente seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98, de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563, o el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452) combinado con cebadores que consisten de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos aproximadamente seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40. Los cebadores también pueden comprender estas secuencias de nucleótidos ubicadas en su extremo 3', y comprender además secuencias no relacionadas o secuencias derivadas de las secuencias de nucleótidos mencionadas, pero que comprenden faltas de coincidencia.

La invención se relaciona además con conjuntos de elementos para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde dichos conjuntos de elementos comprenden al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente a la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5 o el reordenamiento específico dentro de la secuencia de ADN extraño en EE-GH5.

El conjunto de elementos (kit) de la invención puede comprender, además de un cebador que reconoce específicamente la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño de EE-GH5, para su uso en un protocolo de identificación por PCR. Los conjuntos de elementos de la invención pueden comprender al menos dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueadora 5' de EE-GH5, y el otro reconoce una secuencia dentro del ADN extraño. El cebador que reconoce la región flanqueadora 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3, y el cebador que reconoce el transgen puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 6, o cualquier otro cebador, como se describe en la presente.

Además, la invención se relaciona con un conjunto de elementos (kit) para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde dicho conjunto de elementos (kit) comprende los cebadores para PCR que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 y de la SEQ ID N° 6, para su uso en el protocolo de identificación de EE-GH5 por PCR descrito en la presente. Además, la invención se relaciona con un conjunto de elementos (kit) para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde dicho conjunto de elementos (kit) comprende los cebadores de PCR que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 10 y de la SEQ ID N° 11.

La invención también se relaciona con un conjunto de elementos (kit) para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, donde el conjunto de elementos (kit) comprende una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde a (o es complementaria de) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con una región específica de EE-GH5. Preferentemente, la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5 o a una región correspondiente al reordenamiento de ADN extraño específico para EE-GH5. Más preferentemente, la sonda específica tiene (o es complementaria de) una secuencia que presenta entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia desde el nucleótido 78 hasta 119 de la SEQ ID N° 1 o con la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 20 hasta 61 o con la SEQ ID N° 12 desde el nucleótido 52 hasta el nucleótido 88.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se describen secuencias de ADN que comprenden el sitio de inserción del evento y una extensión suficiente de polinucleótidos del ADN genómico de algodón y el ADN extraño (transgen), de modo que son útiles como cebadores o sondas para detectar EE-GH5. Estas secuencias pueden comprender al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de algodón, y una cantidad similar de nucleótidos del ADN extraño (transgen) de EE-GH5, a cada lado del sitio de inserción, respectivamente. Más preferentemente, estas secuencias de ADN comprenden al

menos 9 nucleótidos del ADN genómico de algodón, y una cantidad similar de nucleótidos del ADN extraño contiguo al sitio de inserción en la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2.

Los métodos y conjuntos de elementos abarcados por la presente invención se pueden usar para diferente fines, tales como, pero en un sentido no limitativo los que se indican a continuación para identificar la presencia o ausencia de EE-GH5 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero en un sentido no limitativo productos alimentarios o piensos (frescos o procesados) que comprenden o derivan del material vegetal; además o como alternativa, los métodos y conjuntos de elementos de la presente invención se pueden usar para identificar un material vegetal transgénico a los efectos de segregar el material transgénico del no transgénico; además o como alternativa, los métodos y conjuntos de elementos de la presente invención se pueden usar para determinar la calidad (es decir, el porcentaje de material puro) del material vegetal que comprende al evento EE-GH5.

Además, la invención se relaciona con las regiones flanqueadoras 5' y/o 3' de EE-GH5, así como con los cebadores y las sondas específicas desarrolladas a partir de las regiones flanqueadoras 5' y/o 3' de EE-GH5. La invención también se relaciona con la región del reordenamiento específico de EE-GH5, así como a los cebadores o sondas específicas desarrolladas a partir de dicha región.

La invención también se relaciona con el ADN genómico obtenido de plantas que comprenden al evento elite EE-GH5. Dicho ADN genómico se puede usar como material de control de referencia en los ensayos de identificación descritos en la presente.

Descripción breve de las figuras

Los siguientes Ejemplos, que no pretenden limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, se pueden interpretar en combinación con las Figuras adjuntas, incorporadas en la presente a modo de referencia, en las cuales:

La **Fig. 1** representa de forma esquemática la relación entre las secuencias de nucleótidos y los cebadores citados.

**secuencias y cebadores.** barra negra ADN extraño; barra de rayas negras reordenamiento en el ADN extraño específico para EE-GH5; barra clara ADN de origen vegetal; barra de rayas claras supresión blanco de preinserción; flechas cebadores de oligonucleótidos, las figuras debajo de las barras representan las posiciones de nucleótidos; (c) se refiere al complemento de la secuencia de nucleótidos indicada.

La Fig. 2 representa los resultados obtenidos con el protocolo de identificación por PCR desarrollado para EE-GH5. Secuencia de carga del gel Calle1 Marcador de peso molecular (rampa de 100 bp); calles 2 a 3 muestras de ADN de plantas de algodón que comprenden al evento transgénico EE-GH5; calles 4 a 10 muestras de ADN de plantas de algodón transgénico que no comprenden al evento elite EE-GH5, pero que comprenden un gen similar de resistencia a insectos; calle 11 sin ADN templado control; calle 12 marcador de peso molecular.

La Fig. 3 representa los resultados obtenidos con el protocolo de PCR de calificación de cigosidad desarrollado para EE-GH5. Secuencia de carga del gel Calle1 Marcador de peso molecular (rampa de 100 bp); calles 2 y 3 muestras de ADN de plantas de algodón que comprenden al evento transgénico EE-GH5 en su forma heterocigota; calles 4 Calle fallada 5 muestra de ADN control de una planta de algodón de tipo salvaje; calles 6-7; muestra de ADN de plantas de algodón que comprenden al evento transgénico EE-GH5 en la forma homocigota; calle 8 sin ADN templado control; calle 9 marcador de peso molecular.

Descripción detallada

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta típicamente da como resultado la transformación de una célula o un tejido. El sitio particular de la incorporación comúnmente se debe a una integración "aleatoria".

El ADN introducido en el genoma de la planta como resultado de una transformación de células o tejido vegetal con un ADN recombinante o "un ADN transformante", y que se origina a partir de dicho ADN transformante, se conoce de aquí en adelante

como un "ADN extraño" que comprende uno o más "transgenes". En el contexto de la presente invención, el "ADN vegetal" hará referencia al ADN que se origine en la planta transformada. El ADN vegetal comúnmente se hallará en el mismo locus genético en la planta de tipo salvaje correspondiente. El ADN extraño se puede caracterizar por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma de la planta en el que se ha insertado un ADN recombinante también se conoce como "sitio de inserción" o "sitio blanco". La inserción del ADN recombinante en la región del genoma vegetal conocido como "ADN vegetal de preinserción" se puede asociar con una supresión de ADN vegetal, denominada "supresión del sitio blanco". Una "región flanqueadora" o una "secuencia flanqueadora", según se la usa en la presente, hace referencia a una secuencia de al menos 20 bp, preferentemente al menos 50 bp y de hasta 5000 bp de un ADN diferente del ADN introducido, preferentemente ADN del genoma de la planta, que se localiza inmediatamente 5' y en una posición contigua, o inmediatamente 3' y en una posición contigua a la del ADN extraño. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del ADN extraño dan como resultado transformantes con distintas regiones flanqueadoras, que son características y únicas para cada transformante. Cuando se introduce el ADN recombinante en una planta por medio de un cruzamiento tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta, o sus regiones flanqueadoras, generalmente permanecerá inalterado. Una "región de inserción", según se la usa en la presente, hace referencia a la región que corresponde a la región de al menos 40 bp, preferentemente al menos 100 bp y hasta 10000 bp, abarcada por la secuencia que comprende la región flanqueadora 5' y/o 3' de un ADN extraño en el genoma de la planta. Si se tienen en cuenta las diferencias menores debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción, al cruzarse con una planta de la misma especie, tendrá al menos 85%, preferentemente 90%, más preferentemente 95%, y más preferentemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia que comprende las re-

giones flanqueadoras 5' y 3' del ADN extraño, en la planta obtenida originalmente a partir de la transformación.

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

Un evento elite, según se lo usa en la presente, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos, los cuales se obtienen mediante la transformación con el mismo ADN transformante, o mediante una retrocruza con plantas obtenidas a través de esta transformación, sobre la base de la expresión y la estabilidad del o de los transgenes, y su compatibilidad con las características agronómicas óptimas de la planta que lo comprende. Por consiguiente, los criterios para seleccionar un evento elite son uno o más, preferentemente dos o más, ventajosamente todos los que se indican a continuación:

a) Que la presencia del ADN extraño no compromete otras características deseables de la planta, tales como aquellas relacionadas con el rendimiento agronómico o el valor comercial;

b) Que el evento se caracterice por una configuración molecular bien definida, que se herede en forma estable y para la cual se pueden desarrollar herramientas de

control de identidad apropiadas;

- c) Que el o los genes de interés presenten una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, bajo una condición heterocigota (o hemicigota) y homocigota del evento, a un nivel aceptable para el uso comercial, bajo el rango de condiciones ambientales a las que se puedan exponer las plantas que contengan el evento en el uso agronómico normal.

Se prefiere que el ADN extraño esté asociado con una posición en el genoma de la planta que permita la introducción sencilla en antecedentes genéticos comerciales deseados.

- 10 El estado de un evento como un evento elite se confirma introduciendo el evento elite en distintos antecedentes de relevancia genética, y observando el cumplimiento de uno, dos o la totalidad de los criterios anteriores, por ejemplo a), b) y c).

Por consiguiente, un “evento elite” hace referencia a un locus genético que comprende un ADN extraño, que responde a los criterios descritos previamente. Una planta, un material vegetal o una progenie, tal como semillas, puede comprender uno o más eventos elite en su genoma.

Las herramientas desarrolladas para identificar un evento elite, o la planta, el material vegetal que comprende un evento elite, o productos que comprenden material vegetal que comprende un evento elite, se basan en las características genómicas específicas del evento elite, tales como una restricción específica de la región genómica que comprende el ADN extraño, marcadores moleculares o la secuencia de la o las regiones flanqueadoras del ADN extraño.

Una vez que se han secuenciado una o ambas regiones flanqueadoras del ADN extraño, se pueden desarrollar cebadores y sondas que reconozcan específicamente esta o estas secuencias en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra, mediante el uso de una técnica de biología molecular. Por ejemplo, se puede desarrollar un método de PCR para identificar el evento elite en muestras biológicas (tales como muestras de

plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Esta PCR se basa por lo menos en dos “cebadores” específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueadora 5’ o 3’ del evento elite, y el otro reconoce una secuencia dentro del ADN extraño. Los cebadores tienen preferentemente una secuencia que comprende entre 15 y 35 nucleótidos que, bajo condiciones de PCR optimizadas, “reconoce específicamente” una secuencia dentro de la región flanqueadora 5’ o 3’ del evento elite, y el ADN extraño del evento elite respectivamente, de modo que se amplifica un fragmento específico (“fragmento de integración” o amplicón discriminante) a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende un evento elite. Esto significa que solamente se amplifica el fragmento de integración deseado, y no otra secuencia en el genoma de la planta o el ADN extraño, bajo condiciones de PCR optimizadas.

Los cebadores de PCR apropiados para la invención pueden ser los siguientes

- oligonucleótidos con una longitud que varía en un rango entre 17 nt y 100 nt aproximadamente, que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionada entre la secuencia flanqueadora 5’ (SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta 563) en el extremo 3’ (cebadores que reconocen secuencias flanqueadoras 5’); o
- oligonucleótidos con una longitud que varía entre 17 nt y aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionada entre la secuencia flanqueadora 3’ (complemento de la SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452) en el extremo 3’ (cebadores que reconocen secuencias flanqueadoras 3’); u
- oligonucleótidos con una longitud que varía entre 17 nt y aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos, seleccionada entre las secuencias de

ADN insertadas (complemento de la SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334) en el extremo 3' (cebadores que reconocen ADN extraño); u

- oligonucleótidos con una longitud que varía entre 17 nt y aproximadamente 40 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos, seleccionada entre las secuencias de ADN insertadas (SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40).

Por supuesto, los cebadores pueden tener una longitud mayor que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y por ejemplo, pueden tener 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de longitud, o aún más. Los cebadores pueden consistir por completo de la secuencia de nucleótidos que se selecciona entre las secuencias de nucleótidos de secuencias flanqueadoras y secuencias de ADN extraño mencionadas. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos localizados 3') es menos crítica. Por consiguiente, la secuencia 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias flanqueadoras o de ADN extraño, según sea apropiado, pero puede contener varias faltas de coincidencia (por ejemplo 1, 2, 5, 10). Más aún, la secuencia 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueadoras o de ADN extraño, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que representa sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Preferentemente, estas secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueadoras con faltas de coincidencia no deberían tener más de 100, más preferentemente no más de 50 o aún 25 nucleótidos de longitud.

Más aún, los cebadores apropiados pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos en el extremo 3', que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas de ADN vegetal y las secuencias de ADN extraño (localizadas en los nucleótidos 98-99 en la SEQ ID N° 1 y los nucleótidos 40-41 en la SEQ ID N° 2), siempre que los 17 nucleótidos consecutivos localizados 3' no deriven exclusivamente

del ADN extraño o las secuencias derivadas de plantas en la SEQ ID N° 1 ó 2.

También resultará evidente para los especialistas en la técnica que los pares de cebadores de PCR seleccionados apropiadamente tampoco deberán comprender secuencias complementarias entre sí.

5 A los efectos de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID N° X" es la secuencia de nucleótidos que puede derivar de la secuencia de nucleótidos representada mediante reemplazo de los nucleótidos por su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff ( $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ ) y lectura de la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en la dirección opuesta de la secuencia de nucleótidos representada.

10

Los ejemplos de cebadores adecuados son las secuencias de oligonucleótidos de la SEQ ID N° 7 o SEQ ID N° 17 (cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 5'), SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 18 o SEQ ID N° 19 (cebadores que reconocen al ADN extraño para su uso con los cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 5'), SEQ ID N° 3 (cebadores que reconocen al ADN extraño para su uso con los cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 3'), SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 (cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 3') y las SEQ ID N° 10 y 11 (cebadores que reconocen al reordenamiento de ADN extraño específico en EE-GH5).

15

20 Otros ejemplos de cebadores de oligonucleótidos adecuados comprenden por sus extremos 3' las siguientes secuencias o consisten de dichas secuencias:

a. Cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 5':

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 58 hasta el nucleótido 77
- 25 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 85 hasta el nucleótido 104
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 150 hasta el

nucleótido 166

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 150 hasta el nucleótido 171
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 154 hasta el nucleótido 171
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 87 hasta el nucleótido 104
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 189 hasta el nucleótido 206

10 b. Cebadores que reconocen a la secuencia de ADN extraño para su uso con los cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 5':

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 149 hasta el nucleótido 170
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 169 hasta el nucleótido 186
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 212
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 161 hasta el nucleótido 178
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 211
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 211
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 163 hasta el nucleótido 185
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 210

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 210
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 209
- 5 c. Cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 3':
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 149 hasta el nucleótido 168
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 154 hasta el nucleótido 173
  - 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 140 hasta el nucleótido 159
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 141 hasta el nucleótido 160
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 147 hasta el nucleótido 166
  - 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 167
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 149 hasta el nucleótido 167
  - 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 153 hasta el nucleótido 172
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 154 hasta el nucleótido 174
  - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 160 hasta el nucleótido 177
  - 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 232 hasta el nucleótido 251

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 140 hasta el nucleótido 160
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 141 hasta el nucleótido 161
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 147 hasta el nucleótido 165
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 149 hasta el nucleótido 166
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 166
- 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 147 hasta el nucleótido 167
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 168
- 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 153 hasta el nucleótido 173
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 154 hasta el nucleótido 175
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 156 hasta el nucleótido 175
- 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 232 hasta el nucleótido 250
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 140 hasta el nucleótido 157
- 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 140 hasta el nucleótido 161
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nu-

cleótido 141 hasta el nucleótido 162

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 165

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 149 hasta el nucleótido 165

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 147 hasta el nucleótido 168

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 169

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 156 hasta el nucleótido 174

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 153 hasta el nucleótido 174

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 232 hasta el nucleótido 249

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 234 hasta el nucleótido 251

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 141 hasta el nucleótido 163

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 148 hasta el nucleótido 164

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 147 hasta el nucleótido 169

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 153 hasta el nucleótido 175

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 156 hasta el nucleótido 177

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 181 hasta el nucleótido 198
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 181 hasta el nucleótido 202
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 234 hasta el nucleótido 250
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 140 hasta el nucleótido 162
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 181 hasta el nucleótido 203
- 10
- d. Cebadores que reconocen a la secuencia de ADN extraño para su uso con cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora 3':
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 49
- 15 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 48
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 32 hasta el nucleótido 48
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 32 hasta el nucleótido 49
- 20 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 31 hasta el nucleótido 49
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 31 hasta el nucleótido 48
- 25 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 46

Según se utiliza en la presente, "la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° Z

desde la posición X hasta la posición Y” indica la secuencia de nucleótidos que incluye ambos extremos de nucleótidos.

Preferentemente, el fragmento ampliado tiene una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos, más preferentemente de entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100% idéntica a una secuencia dentro de la región flanqueadora 5' o 3' del evento elite, y el ADN extraño del evento elite, respectivamente, siempre que las faltas de coincidencia aún permitan la identificación específica del evento elite con estos cebadores, bajo condiciones de PCR optimizadas. Sin embargo, es fácil determinar el rango de faltas de coincidencia permitidas en forma experimental, y dicho rango es conocido por los especialistas en la técnica.

En la siguiente tabla se muestran ejemplos de los tamaños esperados para los amplicones de ADN (o los fragmentos de integración), con los pares de cebadores de PCR seleccionados.

| Cebador 1 | Desde la posición | Cebador 2 | Hasta la posición | Longitud del amplicón |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|-----------------------|
| HVH024    | 58                | DPA312    | 186               | 128                   |
| GHI057    | 1                 | MAE115    | 175               | 175                   |
| GHI057    | 1                 | HVH022    | 251               | 251                   |
| GHI057    | 1                 | GHI065    | 369               | 369                   |

La detección de los fragmentos de integración se puede efectuar de diversos modos, por ejemplo, con una estimación del tamaño después de analizar el gel. Los fragmentos de integración también se pueden secuenciar directamente. En la técnica también se conocen otros métodos específicos de la secuencia para detectar fragmentos de ADN amplificados.

Como la secuencia de los cebadores y su localización en el genoma son únicas para el evento elite, la amplificación del fragmento de integración ocurrirá solamente en muestras biológicas que comprendan el evento elite (el ácido nucleico). Preferentemente, cuando se realice una PCR para identificar la presencia de EE-GH5 en muestras

desconocidas, se incluirá un control de un conjunto de cebadores con los cuales pueda amplificarse un fragmento dentro de un “gen de mantenimiento” de la especie vegetal del evento. Los genes de mantenimiento son genes que se expresan en la mayor parte de los tipos celulares, y que se relacionan con las actividades metabólicas básicas co-  
5 munes para todas las células. Preferentemente, el fragmento amplificado a partir del gen de mantenimiento es un fragmento que es mayor que el fragmento de integración amplificado. Según las muestras a analizar, se pueden incluir otros controles.

Los protocolos de PCR estándar están descritos en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª Edición, 1999) y otras referen-  
10 cias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifica en un “protocolo de identificación por PCR” para cada evento elite. Sin embargo, se interpreta que puede ser necesario ajustar una cantidad de pa-  
rámetros en el protocolo de identificación por PCR para condiciones de laboratorio es-  
pecíficas, y se puede modificar ligeramente para obtener resultados similares. Por  
15 ejemplo, el uso de un método diferente para preparar el ADN puede requerir el ajuste, por ejemplo, de la cantidad de cebadores, la polimerasa y las condiciones de alineación usadas. De manera similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condi-  
ciones óptimas para el protocolo de identificación por PCR. Sin embargo, estos ajustes  
serán evidentes para los especialistas en la técnica, y además se detallan en los ma-  
20 nuales de aplicación de PCR actuales, tales como el citado previamente.

Como alternativa, se pueden usar cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración, que se puede usar como “sonda específica” para identificar EE-GH5 en muestras biológicas. La puesta en contacto de un ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, bajo condiciones que permiten la hibridación de la son-  
25 da con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la forma-  
ción de un híbrido entre el ácido nucleico y la sonda. Es posible detectar la formación de este híbrido (por ejemplo, marcando el ácido nucleico o la sonda), donde la formación

de este híbrido indica la presencia de EE-GH5. En la técnica se han descrito estos métodos de identificación basados en la hibridación con una sonda específica (en un vehículo en fase sólida o en solución). La sonda específica preferentemente es una secuencia que, bajo condiciones optimizadas, se hibridiza específicamente con una región dentro de la región flanqueadora 5' o 3' del evento elite, y que preferentemente también comprende parte del ADN extraño contiguo con ella (de aquí en adelante conocido como "región específica"). Preferentemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 bp, preferentemente de entre 100 y 350 bp, que es al menos 80%, preferentemente entre 80 y 85%, más preferentemente entre 85 y 90%, en especial preferentemente entre 90 y 95%, más preferentemente entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferentemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos contiguos, idéntica (o complementarios) a una región específica del evento elite.

Los oligonucleótidos apropiados como cebadores de PCR para detectar el evento elite EE-GH5 también se pueden usar para desarrollar un protocolo basado en PCR, con el fin de determinar el estado de cigosidad del evento elite. Con este objeto, se diseñan dos cebadores que reconocen el locus tipo salvaje, de modo tal que se puedan dirigir uno al otro y que tengan el sitio de inserción localizado entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconozcan específicamente las secuencias flanqueadoras 5' y 3' contenidas dentro de la SEQ ID N° 1 ó 2, respectivamente. Estos cebadores también pueden ser cebadores que reconocen específicamente a la secuencia flanqueadora 5' o 3' (tal como un cebador que presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 7 o las SEQ ID N° 4-6), así como un cebador que reconoce a la región suprimida durante la inserción de EE-GH5 dentro del ADN vegetal de preinserción). Este juego de cebadores, junto con un tercer cebador complementario de las secuencias de ADN transformantes (tal como un cebador que presenta la secuencia de nucleótidos

de la SEQ ID N° 3) permite diagnosticar la amplificación por PCR del locus específico de EE-GH5, así como del locus de tipo salvaje. Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo salvaje correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico, preferentemente con una longitud típica, para el locus transgénico o de tipo salvaje. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR específicos del locus, lo que reflejará la amplificación del locus transgénico y de tipo salvaje.

Además, se pueden desarrollar métodos de detección específicos para el evento elite EE-GH5 diferentes de los métodos de amplificación basados en PCR, usando la información de secuencia específica para el evento elite proporcionada en la presente. Estos métodos de detección alternativos incluyen métodos de detección por medio de la amplificación lineal de señales, basados en el clivaje invasivo de estructuras de ácidos nucleicos particulares, lo que también se conoce como tecnología Invader™ (como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N° 5.985.557, "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", y 6.001.567, "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage", incorporadas en la presente a modo de referencia). Con este fin, la secuencia blanco se puede hibridizar con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 116, o su complemento, o dicho ácido nucleico sonda marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 23 hasta el nucleótido 40, o su complemento, y que hibridiza adicionalmente con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 81 hasta el nucleótido 98, o su complemento, o con dicho ácido nucleico sonda marcado. que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 58, o su complemento, donde el primer y el segundo oligonucleótido se superponen al menos en un nucleótido. La estructura doble o triple producida por esta hibridación permite el clivaje

selectivo de la sonda con una enzima (Cleavease®), lo que deja la secuencia blanco intacta. Posteriormente se detecta la sonda marcada clivada, potencialmente a través de un paso intermedio que da como resultado una amplificación adicional de la señal.

Un “conjunto de elementos [kit]”, según se lo usa en la presente, hace referencia a un conjunto de reactivos cuyo fin es poner en práctica el método de la invención, más particularmente, la identificación del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, o la determinación del estado de cigosidad del material vegetal que contiene EE-GH5. Más particularmente, una realización preferida del conjunto de elementos (kit) de la invención comprende al menos uno o dos cebadores específicos, como se describió anteriormente para la identificación del evento elite, o tres cebadores específicos para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el conjunto de elementos (kit) puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en la presente en el protocolo de identificación por PCR. Como alternativa, de acuerdo con otra realización de esta invención, el conjunto de elementos (kit) puede comprender una sonda específica, como se describió previamente, que se hibridiza específicamente con un ácido nucleico en muestras biológicas, con el fin de identificar la presencia de EE-GH5 en las mismas. Opcionalmente, el conjunto de elementos (kit) puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, en un sentido no limitativo, una solución amortiguadora de hibridación, una marca) para identificar EE-GH5 en muestras biológicas, usando la sonda específica.

El conjunto de elementos (kit) de la invención se puede usar, y sus componentes se pueden ajustar específicamente, con el fin de controlar la calidad (por ejemplo, la pureza de los lotes de semillas), para detectar la presencia o la ausencia del evento elite en el material vegetal o el material que comprende o deriva del material vegetal, tal como, en un sentido no limitativo, productos relacionados con alimentos para seres humanos o animales.

Según se la usa en la presente, la “identidad de secuencia”, con referencia a se-

cuencias de nucleótidos (ADN o ARN), hace referencia a la cantidad de posiciones con nucleótidos idénticos, dividida por la cantidad de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias de nucleótidos se realiza con el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 80:726), usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 y una penalidad de falta de coincidencia de 4. Convenientemente, se pueden realizar análisis e interpretaciones de los datos de secuencia asistidos por computadora, incluyendo las alineaciones de secuencias descriptos previamente, usando el conjunto de software de análisis de secuencia Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se indican como “esencialmente similares” cuando dichas secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, particularmente al menos aproximadamente 80%, más particularmente al menos aproximadamente 85%, aún más particularmente aproximadamente 90%, en especial aproximadamente 95%, más especialmente del 100% aproximadamente. Está claro que cuando se dice que dos secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un grado de identidad de secuencia determinado con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN.

El término “cebador”, según se lo usa en la presente, incluye cualquier ácido nucleico capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso que depende de un templado, tal como la PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de entre 10 y 30 nucleótidos, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proveer en la forma de cadena doble, aunque se prefiere la forma de cadena simple. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero están diseñadas para unirse con el ADN o el ARN blanco, y no es necesario usarlas en un proceso de amplificación.

El término “reconocimiento”, según se lo usa en la presente con referencia a ce-

badores específicos, hace referencia al hecho de que los cebadores específicos se hibridizan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en el evento elite, bajo las condiciones detalladas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación por PCR), donde la especificidad se determina a partir de la presencia de  
5 controles positivos y negativos.

El término “hibridación”, según se lo usa en la presente con referencia a sondas específicas, hace referencia al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del evento elite, bajo condiciones de severidad convencionales. Las condiciones de severidad estándar según se usan en la presente se refie-  
10 ren a las condiciones para hibridación que se describen en la presente o a las condiciones de hibridación convencionales descritas por Sambrook et al., 1989 (*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que pueden comprender, por ejemplo, los siguientes pasos de 1) inmovilizar frag-  
15 mentos de ADN genómico vegetal sobre un filtro, 2) prehibridizar el filtro durante 1 a 2 horas a 42 °C en formamida 50%, SSPE 5 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS 0,1%, o durante 1 a 2 horas a 68 °C en SSC 6 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS 0,1%, 3)  
agregar la sonda de hibridación que ha sido marcada, 4) incubar durante 16 a 24 horas,  
5) lavar el filtro durante 20 minutos a temperatura ambiente en SSC 1X, SDS 0,1%, 6)  
lavar el filtro tres veces durante 20 minutos por vez a 68 °C en SSC 0,2 X, SDS 0,1%, y  
20 7) exponer el filtro durante 24 a 48 horas a una película de rayos X a -70 °C con una pantalla amplificadora.

Según se la usa en la presente, una muestra biológica es una muestra de una planta, un material vegetal o un producto que comprende material vegetal. El término “planta” incluye tejidos vegetales de algodón (*Gossypium hirsutum*), en cualquier etapa  
25 de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano tomado o derivado de cualquiera de estas plantas, incluyendo, en un sentido no limitativo, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameta, cultivo celular, cultivo de tejido o protoplastos. El

“material vegetal”, según se lo usa en la presente, hace referencia un material que se obtiene o deriva de una planta. Los productos que comprenden material vegetal se relacionan con alimentos para seres humanos o animales, u otros productos que se obtienen usando material vegetal, o que pueden estar contaminados por material vegetal. En el contexto de la presente invención, se interpreta que en estas muestras biológicas se evalúa la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GH5, lo que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por consiguiente, los métodos mencionados en la presente para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas se relacionan con la identificación de ácidos nucleicos que comprenden el evento elite en muestras biológicas.

Según se lo usa en la presente, se debe interpretar que el término “que comprende” especifica la presencia de las características, las cifras, los pasos, los reactivos o los componentes citados, pero no excluye la presencia o la adición de una o más características, cifras, pasos, reactivos o componentes, o grupos de los mismos. Así, por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados de hecho, es decir, puede estar embebido en un ácido nucleico o una proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida desde el punto de vista funcional o estructural puede comprender secuencias de ADN adicionales, etc..

La presente invención también se relaciona con el desarrollo de un evento elite EE-GH5 en las plantas de algodón que comprenden este evento, la progenie y las células vegetales obtenidas de estas plantas, o el material vegetal derivado de este evento. Las plantas que comprenden el evento elite EE-GH5 se obtuvieron como se describe en el ejemplo 1.

Las plantas de algodón o el material vegetal que comprende al evento EE-GH5 se pueden identificar de acuerdo con el protocolo de identificación por PCR que se des-

cribe para EE-GH5 en el Ejemplo 2. Brevemente, se amplifica el ADN genómico de algodón presente en la muestra biológica por PCR usando un cebador que reconoce específicamente a la secuencia correspondiente a la secuencia flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID N° 6, y un cebador que re-  
5 conozca a la secuencia en el ADN extraño, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID N° 3. Los cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia endógena de algodón se usan como control positivo para la amplificación por PCR. Si al realizar la amplificación por PCR, el material proporciona un fragmento con el tamaño esperado, el material contiene material vegetal de una planta de algodón que contiene el evento elite  
10 EE-GH5.

Las plantas que contienen al evento EE-GH5 se caracterizan por su resistencia a insectos, así como por su tolerancia a glufosinato. Las plantas que contienen al evento EE-GH5 también se caracterizan por presentar características agronómicas que son comparables a las variedades de algodón disponibles comercialmente en los EE.UU.,  
15 en ausencia de presión por insectos. Se ha observado que la presencia de un ADN extraño en la región de inserción del genoma de la planta de algodón descrita en la presente confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

En los siguientes ejemplos se describe la identificación del evento elite EE-GH5 y  
20 el desarrollo de herramientas para la identificación específica del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas.

A menos que se defina de otra manera en los Ejemplos, todas las técnicas recombinantes se conducen de acuerdo con los protocolos estándar que se describen en "Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª  
25 Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York" y en "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (eds.)(2006) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York".

Los materiales y las referencias estándar se describen en “Croy RDD (ed.) (1993) *Plant Molecular Biology LabFax*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford y Blackwell Scientific Publications, Oxford” y en “Brown TA, (1998) *Molecular Biology LabFax*, 2ª Edición, Academic Press, San Diego”. Los materiales y métodos estándar para las re-  
5 acciones en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden consultar en “McPherson MJ y Møller SG (2000) *PCR (The Basics)*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford” y en “PCR Applications Manual, 3ª Edición (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim o [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com) “

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

- 10 SEQ ID N° 1:secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueadora 5' de EE-GH5
- SEQ ID N° 2:secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueadora 3' de EE-GH5
- SEQ ID N° 3:cebador GHI057
- 15 SEQ ID N° 4:cebador MAE115
- SEQ ID N° 5:cebador HVH022
- SEQ ID N° 6:cebador GHI065
- SEQ ID N° 7:cebador HVH024
- SEQ ID N° 8:cebador DPA312
- 20 SEQ ID N° 9:cebador GHI066
- SEQ ID N° 10:       cebador GHI047
- SEQ ID N° 11:       cebador GHI048
- SEQ ID N° 12:       Secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado a partir del ADN de algodón que comprende al evento EE-GH5 usando GHI047
- 25                       y GHI048
- SEQ ID N° 13:       cebador 1 para la amplificación del fragmento control
- SEQ ID N° 14:       cebador 2 para la amplificación del fragmento control

- SEQ ID N° 15: Secuencia de nucleótidos de la secuencia genómica vegetal blanco antes de la inserción de EE-GH5
- SEQ ID N° 16: Secuencia de nucleótidos que comprende la región flanqueadora 5' de EE-GH5 (larga)
- 5 SEQ ID N° 17: cebador HVH036
- SEQ ID N° 18: cebador SHA028
- SEQ ID N° 19: cebador MAE067

**EJEMPLOS**

**1. Identificación del evento elite EE-GH5**

10 El algodón resistente a insectos se desarrolló por transformación de algodón con un vector que comprende a la secuencia codificante de un gen cry1Ab modificado bajo el control de un promotor S7 del virus del raquitismo del trébol subterráneo.

El evento elite EE-GH5 se seleccionó sobre la base de un procedimiento de selección extenso, basado en la buena expresión y estabilidad del gen de resistencia a insectos, y se evaluó su compatibilidad con características agronómicas óptimas, tales como la altura de la planta, la altura hasta el nodo, la retención de copos, el cupo de aprovechamiento, el vigor, la longitud de las fibras, la fuerza de las fibras y el rendimiento del algodón.

El evento seleccionado se introdujo en distintos antecedentes genéticos comerciales, y se compararon los resultados de las pruebas de campo en distintas localizaciones. Las plantas fueron sometidas a pruebas con plagas de insectos usando diferentes tratamientos. Las plantas exhibieron un buen control de insectos.

Además, el evento presentó una morfología normal de la hoja, la flor y el copo, y una fertilidad excelente, y no presentó una susceptibilidad anormal a enfermedades o insectos en antecedentes genéticos múltiples. Durante la introducción en antecedentes genéticos múltiples, no se observaron problemas aberrantes o anomalías.

**2. Identificación de las regiones flanqueadoras del evento elite EE-GH5**

La secuencia de las regiones flanqueadoras del ADN extraño en el evento elite EE-GH5 se determinó usando el método de PCR térmica asimétrica entrelazada (TAIL), descrito por Liu et al. (1995, *Plant J.* 8(3):457-463) cuando fuera posible. En este método se utilizan tres cebadores anidados en reacciones sucesivas, junto con un cebador arbitrario degenerado más corto, de modo que fuera posible controlar las eficiencias de relativas de amplificación de productos específicos y no específicos desde el punto de vista térmico. Los cebadores específicos se diseñaron de modo que se alinearan con el borde del ADN extraño, y se basaron en sus condiciones de alineación. Se analizó una pequeña cantidad (5 µl) de productos de PCR no purificados, secundarios y terciarios, en un gel de agarosa al 1%. El producto de PCR terciario se purificó y secuenció.

#### 2.1. Región flanqueadora derecha (5')

Se secuenció el fragmento identificado por comprender la región flanqueadora 5' (SEQ ID N° 1). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 98 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 99 y 334 corresponde al ADN extraño. También se secuenció un fragmento más largo que comprende a la región flanqueadora 5' (SEQ ID N° 16). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 563 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 564 y 799 corresponde al ADN extraño.

#### 2.2. Región flanqueadora izquierda (3')

Se secuenció el fragmento identificado como poseedor de la región flanqueadora 3', obtenido con el método de TAIL-PCR (SEQ ID N° 2). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 40 corresponde al ADN extraño, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 41 y 452 corresponde al ADN de la planta.

#### 2.3 Región que comprende el reordenamiento específico de EE-GH5 en el ADN extraño.

Se identificó la secuencia de nucleótidos de una región que comprende al reordenamiento específico de EE-GH5 en el ADN extraño (SEQ ID N° 12). La región entre

las posiciones de nucleótido 52 y 88 se identificó como reordenada cuando se comparaba con el ADN extraño usado para obtener los transformantes de los cuales se seleccionó el evento elite EE-GH5.

**3. Desarrollo de los protocolos de identificación con la reacción en cadena de la polimerasa para EE-GH5**

3.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocían secuencias dentro del evento elite.

Más particularmente, se desarrollaron dos cebadores que reconocen a las secuencias que flanquean al reordenamiento específico de EE-GH5 en el ADN extraño. Los cebadores abarcan una secuencia de 262 bp aproximadamente. Se descubrió que los siguientes cebadores proporcionaban resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR con ADN de EE-GH5

GHI047: 5'-TgC.CTC.TTg.AAC.TgT.AgC-3' (SEQ ID N° 10)

GHI047: 5'-TgC.CTC.TTg.AAC.TgT.AgC-3' (SEQ ID N° 11)

Como alternativa, se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueadora 5' de EE-GH5. Luego se seleccionó un segundo cebador dentro de la secuencia del ADN extraño, de modo que los cebadores abarcaran una secuencia de aproximadamente 369 nucleótidos. Se descubrió que los siguientes cebadores proporcionaban resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR en el ADN de EE-GH5

GHI065: 5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3' (SEQ ID N° 6)

(blanco ADN de la planta)

GHI057: 5' - ATA.gCg.CgC.AAA.CTA.ggA-3' (SEQ ID N° 3)

(blanco ADN del inserto)

Preferentemente se incluyen cebadores que dirigen una secuencia endógena en el cóctel de PCR. Estos cebadores sirven como control interno en muestras desconoci-

das y en el ADN de control positivo. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que hay una buena cantidad de ADN de calidad apropiada en la preparación de ADN genómico como para generar un producto de PCR. Los cebadores endógenos se seleccionaron para que puedan reconocer un gen de mantenimiento en algodón:

GHI001:5'-AAC.CTA.ggC.TgC.TgA.Agg.AgC-3' (SEQ ID N° 13)

GHI002:5'-CAA.CTC.CTC.CAg.TCA.TCT.CCg-3' (SEQ ID N° 14)

3.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

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

Para el par de cebadores GHI047-GHI048: 262 bp (evento elite EE-GH5)

Para el par de cebadores GHI057-GHI065: 369 bp (evento elite EE-GH5)

3.3. ADN templado

Se preparó ADN templado a partir de un receptáculo izquierdo de acuerdo con Edwards *et al.* (*Nucleic Acid Research*, 19, pág. 1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, se debería realizar un procedimiento de prueba utilizando distintas cantidades de templado. Habitualmente, 50 ng de ADN genómico templado proporcionan los mejores resultados.

3.4. Controles positivos y negativos asignados

Para evitar los falsos positivos o negativos, se determinó que se deberían incluir los siguientes controles positivos o negativos en un procedimiento de PCR:

- Control de mezcla maestra (ADN de control negativo). Esta es una PCR en la que no se agrega ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, la ausencia de productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no ha sido contaminado con ADN blanco.
- Un ADN de control positivo (muestra de ADN genómico de la que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control po-

sitivo demuestra que la PCR se realizó bajo condiciones que permitieron la amplificación de las secuencias deseadas.

- Un ADN de control tipo salvaje. Esta es una PCR en la que el ADN templado proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, la ausencia de amplificación de un producto de PCR transgénico, sino la amplificación del producto de PCR exógeno, esto indica que no hay una amplificación de antecedente transgénico detectable en una muestra de ADN genómico.

3.5. Condiciones de la PCR

- Se obtuvieron resultados óptimos bajo las siguientes condiciones:
  - la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:
    - 2,5 µl de ADN templado
    - 2,5 µl de solución amortiguadora de amplificación 10x (suministrado por el proveedor con la Taq polimerasa)
    - 0,5 µl de dNTP 10 mM
    - 0,4 µl de GHI001 (10 pmoles/µl)
    - 0,4 µl de GHI002 (10 pmoles/µl)
    - 0,7 µl de GHI047 (10 pmoles/µl) o GHI057 (protocolo de PCR 2)
    - 0,7 µl de GHI048 (10 pmoles/µl) o GHI065 (protocolo de PCR 2)
    - 0,1 µl de ADN Taq polimerasa (5 unidades/µl)
    - agua hasta completar 25 µl
  - el perfil de termociclado a seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:
    - 4 min a 95 °C
    - Seguido por: 1 min a 95 °C
    - 1 min a 57°C
    - 2 min a 72°C
    - Por 5 ciclos

Seguido por: 30 seg a 92 °C

30 seg a 57°C

1 min a 72°C

Por 25 ciclos

5           Seguido por: 10 minutos a 72 °C

3.6. Análisis con gel de agarosa

Para visualizar en forma óptima los resultados de la PCR, se determinó que se deberían aplicar entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (solución amortiguadora de tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo, la rampa de 100 bp de PHARMACIA).

3.7. Validación de los resultados

Se determinó que los datos de las muestras de ADN de las plantas transgénicas dentro de un único procedimiento de PCR y un único cóctel de PCR no deberían ser aceptables a menos que 1) el ADN de control positivo presentara los productos de PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el ADN de control negativo fuera negativo para la amplificación por PCR (ausencia de fragmentos), y 3) el ADN control tipo salvaje presentara el resultado esperado (amplificación de fragmentos endógenos).

Cuando se sigue el protocolo de identificación de EE-GH5 por PCR como se describió previamente, las calles que presentan cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados indican que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN, ha heredado el evento elite EE-GH5. Las calles que no presentan cantidades visibles de cualquiera de los productos de PCR transgénicos y presentan cantidades visibles del producto de PCR endógeno indican que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN genómico, no comprende el evento elite. Las calles que no presentan cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos indican que la calidad y/o la cantidad de ADN genómico no permitió generar un producto de PCR. Estas plantas no pueden ser calificadas.

Sería necesario repetir la preparación de ADN genómico y realizar un nuevo procedimiento de PCR, con los controles apropiados.

### 3.8. Uso de un protocolo de PCR discriminante para identificar EE-GH5

Antes de intentar analizar muestras desconocidas, fue necesario realizar un procedimiento de prueba con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado podría requerir la optimización para componentes que pudieran diferir entre laboratorios (preparación de ADN templado, ADN polimerasa Taq, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

La amplificación de la secuencia endógena tiene una función clave en el protocolo. Es necesario alcanzar las condiciones de PCR y termociclado que permiten amplificar cantidades equimolares de las secuencias endógenas y transgénicas con un templado de ADN genómico transgénico conocido. Cuando el fragmento endógeno deseado no es amplificado, o cuando las secuencias deseadas no se amplifiquen con las mismas intensidades bajo una coloración con bromuro de etidio, tal como se podrá evaluar con una electroforesis en gel de agarosa, podrá ser necesario optimizar las condiciones de PCR.

Se evaluó material foliar de una cantidad de plantas de algodón, algunas de las cuales comprendían EE-GH5, de acuerdo con el protocolo descrito previamente. Se tomaron muestras del evento elite EE-GH5 y de algodón tipo salvaje como controles positivos y negativos, respectivamente.

En la Figura 2 se ilustra el resultado obtenido con el protocolo 1 de identificación por PCR para el evento elite EE-GH5 en una cantidad de muestras de plantas de algodón. Se descubrió que las muestras en las calles 2 a 3 contenían el evento elite como una banda detectable de 305 bp, mientras que las muestras en las calles 4 a 10 no comprendían EE-GH5. Las calles 4 y 10 comprenden otros eventos elite de algodón (incluyendo plantas que comprende diferentes genes quiméricos de tolerancia a insectos); la calle 11 representa la muestra de control negativo (agua) y las calles 1 y 12 represen-

tan al marcador de peso molecular (rampa de 100 bp).

**4. Uso de un fragmento de integración específico como una sonda para detectar el material que comprende EE-GH5**

Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GH5 por medio de una  
5   amplificación por PCR, usando los cebadores específicos GHI047 (SEQ ID N° 10) y  
GHI048 (SEQ ID N° 11), o por síntesis química, y se lo marca. Este fragmento de inte-  
gración se usa como una sonda específica para detectar EE-GH5 en muestras biológi-  
cas. Se extrae el ácido nucleico de las muestras de acuerdo con procedimientos con-  
vencionales. Luego se pone en contacto este ácido nucleico con la sonda específica,  
10   bajo condiciones de hibridación que están optimizadas para permitir la formación de un  
híbrido. Luego se detecta la formación del híbrido para indicar la presencia del ácido  
nucleico de EE-GH5 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras  
se amplifica usando los cebadores específicos, antes de ponerlo en contacto con la  
sonda específica. Como alternativa, el ácido nucleico se marca antes de ponerlo en  
15   contacto con la sonda específica, en lugar de con el fragmento de integración. Opcio-  
nalmente, la sonda específica se une a un vehículo sólido (tal como, en un sentido no  
limitativo, un filtro, una cinta o esferas), antes de ponerla en contacto con las muestras.

**5. Protocolo para la determinación basada en PCR del estado de cigosidad de ma-  
terial de plantas de algodón EE-GH5**

5.1. Cebadores

Se diseñaron dos cebadores que reconocieran las secuencias de nucleótidos del  
locus tipo salvaje antes de la inserción del evento elite, de modo tal que pudieran dirigir-  
se uno al otro, y que tuvieran el sitio de inserción entre ellos. Este conjunto de cebado-  
res, junto con un tercer cebador complementario con las secuencias de ADN extraño y  
25   dirigido hacia el ADN flanqueadora, permite la amplificación por PCR simultánea del lo-  
cus EE-GH5, así como del locus de tipo salvaje.

Se descubrió que los siguientes cebadores proporcionaban resultados particu-

larmente claros y reproducibles en una reacción de PCR para calificar la cigosidad en ADN de EE-GH5

GHI066 5'- AgA.TAA.AAT.CgT.CAg.TgC.Tg-3' (SEQ ID N° 9) (blanco ADN de la planta 5' con respecto a la secuencia flanqueadora 5')

5 GHI057 5' - ATA.gCg.CgC.AAA.CTA.ggA-3' (SEQ ID N° 3) (blanco ADN del inserto)

GHI065 5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3' (SEQ ID N° 6) (blanco ADN de la planta de la secuencia flanqueadora 3')

## 5.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

10 Para el par de cebadores GHI065 – GHI066: 517 bp (locus de tipo salvaje)

Para el par de cebadores GHI057 – GHI065: 369 bp (locus de EE-GH5)

## 5.3. ADN templado

Se preparó ADN templado a partir de un receptáculo izquierdo de acuerdo con Edwards *et al.* (*Nucleic Acid Research*, 19, pág. 1349, 1991). Cuando se usa ADN pre-  
15 parado con otros métodos, se debería realizar un procedimiento de prueba utilizando distintas cantidades de templado. Habitualmente, 50 ng de ADN genómico templado proporcionan los mejores resultados.

## 5.4. Controles positivos y negativos asignados

Para evitar los falsos positivos o negativos, se determinó que se deberían incluir  
20 los siguientes controles positivos o negativos en un procedimiento de PCR:

- Control de mezcla maestra (ADN de control negativo). Esta es una PCR en la que no se agrega ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, la ausencia de productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no ha sido contaminado con ADN blanco.
- 25 - Un ADN de control positivo (muestra de ADN genómico de la que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se realizó bajo condiciones que permitieron la

amplificación de las secuencias deseadas.

- Un ADN de control tipo salvaje. Esta es una PCR en la que el ADN templado proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, la ausencia de amplificación de un producto de PCR transgénico, sino la amplificación del producto de PCR exógeno, esto indica que no hay una amplificación de antecedente transgénico detectable en una muestra de ADN genómico.

### 5.5. Condiciones de la PCR

Se obtuvieron resultados óptimos bajo las siguientes condiciones:

- 10 - la mezcla de PCR para reacciones de 25  $\mu$ l contiene:
  - x  $\mu$ l de ADN del templado (150 ng)
  - 2,5  $\mu$ l de solución amortiguadora de amplificación 10x (suministrado por el proveedor con la Taq polimerasa)
  - 0,5  $\mu$ l de dNTP 10 mM
  - 15 1,5  $\mu$ l de GHI053 (10 pmoles/ $\mu$ l)
  - 1,0  $\mu$ l de GHI054 (10 pmoles/ $\mu$ l)
  - 0,5  $\mu$ l de GHI041 (10 pmoles/ $\mu$ l)
  - 0,1  $\mu$ l de ADN Taq polimerasa (5 unidades/ $\mu$ l)
  - agua hasta completar 25  $\mu$ l
- 20 - el perfil de termociclado a seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:
  - 4 min a 95 °C
  - Seguido por: 1 min a 95 °C
    - 1 min a 57°C
    - 2 min a 72°C
  - 25 Por 5 ciclos
  - Seguido por: 30 seg a 92 °C
    - 30 seg a 57°C

1 min a 72°C

Por 25 ciclos

Seguido por: 10 minutos a 72 °C

#### 5.6. Análisis con gel de agarosa

- 5        Para visualizar en forma óptima los resultados de la PCR, se determinó que se deberían aplicar entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (solución amortiguadora de tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo, la rampa de 100 bp de PHARMACIA).

#### 5.7. Validación de los resultados

- 10       Los datos de las muestras de ADN de la planta transgénica de una sola corrida de PCR y una sola PCR

La mezcla maestra Master Mix no será aceptable a menos que:

- el control positivo presente los productos de PCR esperados (amplificación del blanco transgénico)
- 15 - el ADN de control positivo tipo salvaje presente el resultado esperado (amplificación del blanco tipo salvaje)
- el control negativo sea negativo para la amplificación por PCR (ausencia de fragmentos).

- 20       Las calles que presentan cantidades visibles del producto de PCR transgénico del tamaño esperado, y que no presentan cantidades visibles del producto de PCR tipo salvaje, indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN templado es homocigota para el casote genético transgénico.

- 25       Las calles que presentan cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y tipo salvaje de los tamaños esperados indican que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN templado, es hemicigota para el casete genético transgénico. Las calles que no presentan cantidades visibles del producto de PCR transgénico, y que presentan cantidades visibles del producto de PCR tipo salvaje indi-

can que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN templado, no ha heredado la secuencia transgénica evaluada, por lo que es homocigota para el locus tipo salvaje.

Las calles que no presentan cantidades visibles de productos de PCR transgénicos y tipo salvaje indican que la calidad y/o la cantidad de ADN genómico no permitió generar un producto de PCR. Estas plantas no pueden ser calificadas. Sería necesario repetir la preparación de ADN genómico y realizar un nuevo procedimiento de PCR, con los controles apropiados.

5.8. Uso del protocolo de análisis de la cigosidad para identificar el estado de cigosidad en plantas que contienen EE-GH5

En la Figura 3 se ilustra el resultado obtenido con la PCR para calificar la cigosidad de EE-GH5 en una cantidad de muestras de algodón. Se encontró que las muestras en las calles 2-3 y 6-7 contenían al fragmento de la PCR (369 bp) característico del evento elite EE-GH5, en tanto las muestras en las calles 2, 3 y 5 contenían al fragmento característico de la presencia del locus de tipo salvaje. Por ello las calles 6 y 7 contienen al evento EE-GH5 en la forma homocigota, las calles 2 y 3 contienen al evento EE-GH5 en la forma hemicigota y la calle 5 contiene al locus de tipo salvaje en la forma homocigota (acigota para EE-GH5). La calle 8 representa la muestra de control negativo (agua) y las calles 1 y 9 representan al marcador de peso molecular (rampa de 100 bp).

## 6. Introducción de EE-GH5 en cultivares preferidos

El evento elite EE-GH5 se introduce mediante una retrocruza repetitiva en cultivares de algodón comerciales, tales como, en un sentido no limitativo, FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 y FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044, FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 o FM5024.

Se observa que la introducción del evento elite en estos cultivares no afecta significativamente ninguna de las características fenotípicas o agrícolas deseables de es-

tos cultivares (no hay arrastre de enlace), mientras que la expresión del transgen, determinada a través de la tolerancia al glufosinato, satisface los niveles aceptables desde el punto de vista comercial. Esto confirma el estado del evento EE-GH5 como un evento elite.

5 El evento elite se puede combinar ventajosamente con otros eventos elite disponibles en el mercado, en particular otro gen de resistencia a insectos de un evento elite para el manejo de resistencia a insectos, tal como pero en un sentido no limitativo el evento 3006-210-23; (USDA, Solicitud Aphis 03-036-02p), evento 281-24-236 (USDA, Solicitud Aphis 03-036-01p); evento MON158985 (USDA, Solicitud Aphis 00-342-01p);  
10 evento MON531 (USDA, Solicitud Aphis 94-308-01p) o evento COT102 (= vip3A de Syngenta) USDA, Solicitud Aphis 03-155-01p. El evento elite EE\_GH5 también se puede combinar con eventos elite tolerantes a herbicidas, tal como el evento MON1445 (USDA, Solicitud Aphis 95-045-01p) o evento MON88913 (USDA, Solicitud Aphis 04-086-01p).

15 Según se lo usa en las reivindicaciones más adelante, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" abarca tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano extraído o derivado de una de cualquiera de estas plantas, incluyendo, en un sentido no limitativo, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameta, cultivo celular, cultivo de tejido o proto-  
20 plasto.

Las semillas de referencia que comprenden al evento elite EE-GH5 se sembraron como EE-GH5 en ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 22 de enero, 2007, bajo el N° de acceso de ATCC, PTA-8171. Un nombre alternativo para EE-GH5 es T304-40

25 Según se lo usa en las reivindicaciones más adelante, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" abarca tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano extraído o derivado de una de

cualquiera de estas plantas, incluyendo, en un sentido no limitativo, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameta, cultivo celular, cultivo de tejido o protoplasto.

La descripción de la invención anterior pretende ser ilustrativa y no limitante.

5 Los especialistas en la técnica podrán concebir diversos cambios o modificaciones en las realizaciones descriptas. Éstas se pueden efectuar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

10

<110> Bayer BioScience N.V.

Trolinder, Linda

Moens, Sofie

Paelinck, Dimitri

15

Habex, Veerle

Van Herck, Hans

<120> Plantas de algodón con tolerancia a insectos y métodos para identificarlas

20

<130> BCS06-2011b

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 334

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueadora 5' de EE-  
GH5

<220>

10 <221> caract\_misc

<222> (1)..(98)

<223> ADN de la planta

<220>

15 <221> caract\_misc

<222> (99)..(334)

<223> ADN del inserto

<400> 1

20 cttttatcat ataagtcct atataaataa agtttagtca gtcaaattag agagattgtc 60

attgtaggga gttgtccaa ttattggtgt tttaatccc agtactcggc cgtcgaccgc 120

ggtaccccg g aattgaaaac agatttgagg ttcaaagtg gtgtgtggc tacagttcaa 180

25

gaggcattaa aagctgattt ggccggatct ttgaagctt tcaaacacaa ggaaatcatc 240

catcaacctc caatcgaatg gcttttgct tggcacaata attcccctac ttgcacttg 300

aggacaagtc gattttccgg gccggatgta ttga 334

5

<210> 2

<211> 452

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueadora 3' de EE-GH5

15

<220>

<221> caract\_misc

<222> (1)..(40)

<223> ADN del inserto

20

<220>

<221> caract\_misc

<222> (41)..(452)

<223> ADN de la planta

25

<400> 2

atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatctcct tttcttttc 60

aagttatccc aagatctagg ggtattttgc atcattaaga gaaaactttg ttaattaga 120

cttccaatca ccagtcttag gtataaggga aggctgatgc cgataacatt gccgaacaaa 180

5 ccatcaaggc aactagagat gccttgatgc aaaagagctc ttttttagac cctcaaatgc 240

caagcagtgg atagaaagaa gctcaatggt aagtgcaaac aaaattcgaa aggctaaaag 300

tttatcgaga ttcgaatctc taaatcaatg tcattaacaa ctatataaca ggctaatttt 360

10

atccggccca ataaataaaa caaaataaaa ataataaatc aaggtaatt tacaaaatag 420

attggcccaa acaaaaaaga gcccaataac cc 452

15

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI057

<400> 3

25

atagcgcgca aactagga 18

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos MAE115

<400> 4

tcggcaatgt tatcggcatac 20

10

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos HVH022

20 <400> 5

ccactgcttg gcatttgag 19

<210> 6

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI065

<400> 6

5 gggccggata aaattagcct 20

<210> 7

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos HVH024

15

<400> 7

gtcattgtag ggagtttgtc 20

20 <210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos DPA312

<400> 8

tgctcttga actgtagc 18

5 <210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI066

<400> 9

agataaaatc gtcagtgtg 20

15

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI047

25 <400> 10

tgctcttga actgtagc 18

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI048

<400> 11

10 acttgcagtt gctgatgatg 20

<210> 12

<211> 262

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado a partir del ADN de algodón

20 que comprende EE-GH5 usando GHI047 y GHI048

<220>

<221> caract\_misc

25 <222> (1)..(51)

<223> secuencia derivada de me1 3'

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (86)..(88)  
<223> secuencia derivada del borde derecho del ADN-T

5

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (89)..(262)  
<223> secuencia derivada de me1 3'

10

<400> 12  
tgctcttga actgtagcca caacaccact ttgaaacctc aaatctgttt tcaattccgg 60

ggfaccgcgg tcgacggccg agtactggcc aaatttagtt ttggataaa gtaccagatt 120

15

tagggcaata aaactataaa cggccagctt ttagctacat acaatgagca ttctgataa 180

acaaagaacc caaccggtat ttgtaagtga ataaacaaaa gtagtattaa gctttaagtt 240

20 tccatcatca gcaactgcaa gt 262

<210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI001

<400> 13

5   aacctaggct gctgaaggag c 21

<210> 14

<211> 21

10   <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos GHI002

15

<400> 14

caactcctcc agtcatctcc g 21

20   <210> 15

<211> 558

<212> ADN

<213> Artificial

25   <220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la secuencia genómica blanco de la planta antes de la inserción de EE-GH5

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (1)..(113)  
<223> secuencia correspondiente a la secuencia flanqueadora 5'

5

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (114)..(145)  
<223> supresión de preinserción en el evento elite EE-GH5

10

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (146)..(558)  
<223> secuencia correspondiente a la secuencia flanqueadora 3'

15

<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (457)..(475)  
<223> secuencia correspondiente al complemento del oligonucleótido GHI065

20

<400> 15  
agtttatatt tcttactttt atcatataag tgcctatata aataaagttt agtcagtcaa 60

attagagaga ttgtcattgt agggagtttg tccaattatt ggtgttttta atcacaagtt 120

25

gtttaaggat tccaaacat acattatcta tctccttttt ctttcaagt tatcccaaga 180

tctaggggta tttgcatca ttaagagaaa actttgttta attagacttc caatcaccag 240

tcttaggtat aagggaaggc tgatgccgat aacattgccg aacaaacat caaggcaact 300

5 agagatgcct tgatgcaaaa gagctctttt ttagaccctc aaatgccaag cagtggatag 360

aaagaagctc aatgttaagt gcaaacaaaa ttcgaaaggc taaaagtta tcgagattcg 420

aatctctaaa tcaatgtcat taacaactat ataacaggct aattttatcc ggccaataa 480

10

ataaaacaaa ataaaaataa taaatcaagg tcaattlaca aaatagattg gcccaaacaa 540

aaaagagccc aataaccc 558

15

<210> 16

<211> 799

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueadora 5' de EE-GH5 (larga)

25

<220>

<221> caract\_misc

<222> (1)..(563)

<223> ADN de la planta

<220>

5 <221> caract\_misc

<222> (564)..(799)

<223> ADN del inserto

<400> 16

10 aacaaataag ccaattccaa agagaggata gctgatcttt tcactaatca taacttgaat 60

tttttagtg gtgcttatct gtttcagggtg ttaggagcac aatcatacca ttcctgcat 120

aatttcaga ctctaggatg aatccttttc gaagaggagg tgaatgatac gaactcagaa 180

15

agggtaaatt catttgagtt caagtttggg acactgacca acttgcaatg aattttggg 240

ttaaattatt ttctttatgg atcatgaaat gatataattt ttaaaatttt aagatgttta 300

20 ttattcatt taattatagt ttgattatat acatttgtaa aattgaatat ttatttggtt 360

ttaaagtta ttaatttctt gtttattcat taaataaagt tcaattatag ataaaatcgt 420

cagtgcgtaa ttttatatta ttttattaga agtttatatt tcttactttt atcatataag 480

25

tgccatatata aataaagttt agtcagtcaa attagagaga ttgtcattgt agggagtttg 540

tccaattatt ggtgttttta atcccagtac tcggccgtcg accgcggtac cccggaattg 600

aaaacagatt tgaggtttca aagtgggtgt gtggctacag ttcaagaggc attaaaagct 660

5 gatttgccg gatctttga agctttcaaa cacaaggaaa tcatccatca acctccaatc 720

gaatggcttt ttgctggca caataattcc cctactttcg actgaggac aagtcgattt 780

tccggggccgg atgtattga 799

10 <210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos HVH036

<400> 17

caggtgttag gagcacaatc 20

20

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos SHA028

<400> 18

cacaacacca ctttgaaacc tcaa 24

5

<210> 19

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos MAE067

15 <400> 19

ccattcgatt ggaggttga 19

### REIVINDICACIONES

1. Una planta de algodón transgénico, o células, partes, semillas o progenie de la misma, CARACTERIZADA porque cada una comprende el evento elite EE-GH5 en su genoma, donde las semillas de referencia que comprenden dicho evento se han depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-8171.  
5
2. La planta, semillas, células, partes o progenie de algodón transgénico de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque su ADN genómico, cuando es analizado usando el protocolo de identificación de evento elite para EE-GH5 con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 10 y SEQ ID N° 11, respectivamente, permite obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 262 bp o cuando es analizado usando el protocolo de identificación de evento elite para EE-GH5 con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 3 y de la SEQ ID N° 6, respectivamente, permite obtener un fragmento de ADN de aproximadamente  
10 369 bp.  
15
3. Semillas que comprenden el evento elite EE-GH5, CARACTERIZADAS porque han sido depositadas en la ATCC con el número de depósito PTA-8171, o derivados de las mismas.  
20
4. Una planta de algodón, o una parte de la misma o semillas obtenidas de la misma, CARACTERIZADA porque ha sido obtenida a partir de la semilla de la reivindicación 3.
5. Una planta de algodón, o semillas, células o tejidos de la misma, donde cada uno de ellos comprende el evento elite EE-GH5 en su genoma, CARACTERIZADA porque se ha obtenido mediante la propagación y/o el cruzamiento con una planta de algodón cultivada a partir de la semilla depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-  
25

8171.

6. Una semilla de algodón que comprende el evento elite EE-GH5, CARACTERIZADA porque la semilla de referencia que comprende dicho evento ha sido depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-8171.

7. Una planta, células o tejidos de algodón transgénico, CARACTERIZADA porque comprende al evento elite EE-GH5, producida a partir de las semillas de la reivindicación 6.

8. Un método para producir una planta o semillas de algodón que comprende al evento elite EE-GH5, CARACTERIZADO porque comprende cruzar una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 37 con otra planta de algodón y plantar las semillas obtenidas de dicho cruzamiento.

9. ADN genómico de algodón, CARACTERIZADO porque comprende al evento elite EE-GH5.

10. ADN genómico, CARACTERIZADO porque fue producido a partir de una planta, una célula vegetal o una semilla de algodón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Un método para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, CARACTERIZADO porque comprende la detección de una región específica para EE-GH5 con un cebador o una sonda específica, que reconoce específicamente la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5.

12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 100 y 500 bp a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, donde uno de dichos cebadores que reconoce a la región flanqueadora 5' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 5' presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o la región flanqueadora 3' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 3' presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, donde el otro cebador de dichos cebadores que reconocen a una secuencia dentro del ADN extraño presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.
13. El método de la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 5' consiste de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 3' de EE-GH5 consiste de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño consiste de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

14. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 5' comprende por su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 3' de EE-GH5 comprende por su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, y dicho cebador que reconoce a la secuencia dentro del ADN extraño comprende por su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

15. El método de la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID N° 3 y la SEQ ID N° 6, respectivamente.

16. El método de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el método comprende amplificar un fragmento de aproximadamente 369 bp usando el protocolo de identificación de EE-GH5.

17. Un conjunto de elementos (kit) para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, CARACTERIZADO porque comprende un cebador que reconoce a la región flanqueadora 5' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 5' presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o un cebador que reconoce a la región flanqueadora 3' de EE-GH5, donde dicha

región flanqueadora 3' presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, y un cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño, donde dicho ADN extraño presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

18. El conjunto de elementos (kit) de la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque dicho cebador que reconoce la región flanqueadora 5' consiste de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o dicho cebador que reconoce la región flanqueadora 3' de EE-GH5 consiste de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, y dicho cebador que reconoce a la secuencia dentro del ADN extraño consiste de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

19. El conjunto de elementos (kit) de la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 5' comprende por su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora 3' de EE-

GH5 comprende por su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452, y dicho cebador que reconoce a la secuencia dentro del ADN extraño comprende por su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

20. El conjunto de elementos (kit) de la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque comprende un cebador que consiste en la secuencia de la SEQ ID N° 3 y un cebador que consiste en la secuencia de la SEQ ID N° 6.

21. Un cebador adecuado para su uso en una detección específica de EE-GH5, CARACTERIZADO porque presenta una secuencia que, bajo condiciones de detección optimizadas reconoce específicamente una secuencia de la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 5' presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 y donde dicha región flanqueadora 3' presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452.

22. El cebador de la reivindicación 21, CARACTERIZADO porque dicho cebador consiste de una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID

Nº 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452.

23. El cebador de la reivindicación 21, CARACTERIZADO porque dicho cebador comprende por su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID Nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID Nº 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563 o una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID Nº 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452.

24. Un cebador CARACTERIZADO porque comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID Nº 3.

25. Un cebador CARACTERIZADO porque comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID Nº 6.

26. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque el método comprende hibridizar un ácido nucleico de muestras biológicas con una sonda específica para EE-GH5.

27. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO porque la secuencia de dicha sonda específica presenta al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueadora 5' o la secuencia flanqueadora 3' de EE-GH5, y la secuencia del ADN extraño contiguo de ella.

28. El método de la reivindicación 27, CARACTERIZADO porque la secuencia de dicha sonda específica presenta al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID Nº

1, desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 119, o SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 61, o el complemento de dichas secuencias.

29. Un conjunto de elementos (kit) para identificar el evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, CARACTERIZADO porque dicho conjunto de elementos (kit) comprende una sonda específica capaz de hibridizarse específicamente con una región específica de EE-GH5.

30. El conjunto de elementos (kit) de la reivindicación 29, CARACTERIZADO porque la secuencia de dicha sonda específica presenta al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueadora 5' o la secuencia flanqueadora 3' de EE-GH5, y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella.

31. El conjunto de elementos (kit) de la reivindicación 30, CARACTERIZADO porque la secuencia de dicha sonda específica presenta al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 119, o SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 61, o el complemento de dichas secuencias.

32. Una sonda específica CARACTERIZADA porque es para la identificación del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas.

33. La sonda de la reivindicación 32, CARACTERIZADA porque presenta al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueadora 5' o la secuencia flanqueadora 3' de EE-GH5, y la secuencia del ADN extraño contiguo de ella, o el complemento de la misma.

34. La sonda de la reivindicación 33, CARACTERIZADA porque presenta al menos

80% de identidad de secuencia con SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 119, o SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 61, o el complemento de dichas secuencias.

- 5 35. Una sonda específica para la identificación del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas, CARACTERIZADA porque la secuencia es esencialmente similar a SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 119, o SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 61, o el complemento de dichas secuencias.
- 10 36. Un método para confirmar la pureza de semillas, CARACTERIZADO porque el método comprende la detección de una región específica para EE-GH5 con un cebador o una sonda específica, que reconoce específicamente la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, en muestras de semillas.
- 15 37. Un método para analizar la presencia de EE-GH5 de semillas, CARACTERIZADO porque el método comprende la detección de una región específica para EE-GH5 con un cebador o una sonda específica, que reconoce específicamente la región flanqueadora 5' o 3' de EE-GH5, en muestras de lotes de semillas.
- 20 38. Un método para determinar el estado cigosidad de una planta, material vegetal o semillas que comprende al evento elite EE-GH5, CARACTERIZADO porque dicho método comprende amplificar fragmentos de ADN de entre 100 y 500 bp a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos tres cebadores, donde dos de dichos cebadores reconocen
- 25 específicamente el ADN vegetal de preinserción, tal como la región flanqueadora 5' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 5' presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos

de la SEQ ID N° 16 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 563, o la región flanqueadora 3' de EE-GH5, donde dicha región flanqueadora 3' presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 452 o el ADN de preinserción presenta la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 15 o el complemento de la misma, donde el tercero de dichos cebadores que reconocen una secuencia dentro del ADN extraño presenta la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 40.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 38, CARACTERIZADO porque dicho primer cebador comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 6, dicho segundo cebador comprende la secuencia de la SEQ ID N° 9, y dicho tercer cebador comprende la secuencia de la SEQ ID N° 3.

40. Un método para detectar la presencia del evento elite EE-GH5 en muestras biológicas por medio de una hibridación con un ácido nucleico sonda sustancialmente complementario y marcado, donde la relación entre la sonda y el ácido nucleico blanco se amplifica mediante el reciclado de la secuencia de ácido nucleico deseada, CARACTERIZADO porque dicho método comprende:

- a) hibridizar dicha secuencia de ácido nucleico deseada con un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 1, desde el nucleótido 99 hasta el nucleótido 116, o su complemento, o donde dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 23 hasta el nucleótido 40, o el complemento de la misma;
- b) hibridizar dicha secuencia de ácido nucleico deseada con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°

1, desde el nucleótido 81 hasta el nucleótido 98, o su complemento, o donde dicha sonda comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 2, desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 58, o su complemento, donde dicho primer y dicho segundo oligonucleótido se superponen en al menos un nucleótido, y donde dicho primer y dicho segundo oligonucleótido están marcados para que sean dicha sonda de ácido nucleico;

- c) cortar solamente la sonda marcada dentro de la dupla compuesta por la sonda y la secuencia de ácido nucleico deseada con una enzima que provoca el clivaje selectivo de la sonda, lo que da como resultado la disociación de la dupla dejando la secuencia deseada intacta;
- d) reciclar la secuencia de ácido nucleico deseada repitiendo los pasos (a) a (c); y
- e) detectar la sonda marcada clivada determinando así la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico deseada.

41. Una molécula aislada de ácido nucleico, CARACTERIZADA porque comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 88 hasta el nucleótido 109 o la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 30 al 50, o el complemento de dichas secuencias.

42. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 41, CARACTERIZADA porque comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID N° 1 desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 119 o a la SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 20 to 60, o el complemento de dichas secuencias.

43. Un fragmento aislado de ácido nucleico, CARACTERIZADO porque comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N° 12.

44. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque comprende amplificar un fragmento de ADN de aproximadamente 262 bp usando cebadores que consiste esencialmente de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N° 10 y de la SEQ ID N° 11, respectivamente.

5

45. Un conjunto de elementos, CARACTERIZADO porque comprende dos cebadores de oligonucleótidos que consiste esencialmente de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N° 10 y de la SEQ ID N° 11, respectivamente.

## PLANTAS DE ALGODÓN CON TOLERANCIA A INSECTOS Y MÉTODOS PARA IDENTIFICARLAS

### RESUMEN

Plantas, material vegetal y semillas de algodón transgénico específico, caracteri-  
5 zadas porque estos productos contienen un evento de transformación específico en una  
localización específica en el genoma del algodón. También se proporcionan herramien-  
tas que permiten la identificación rápida e inequívoca del evento en muestras biológi-  
cas.

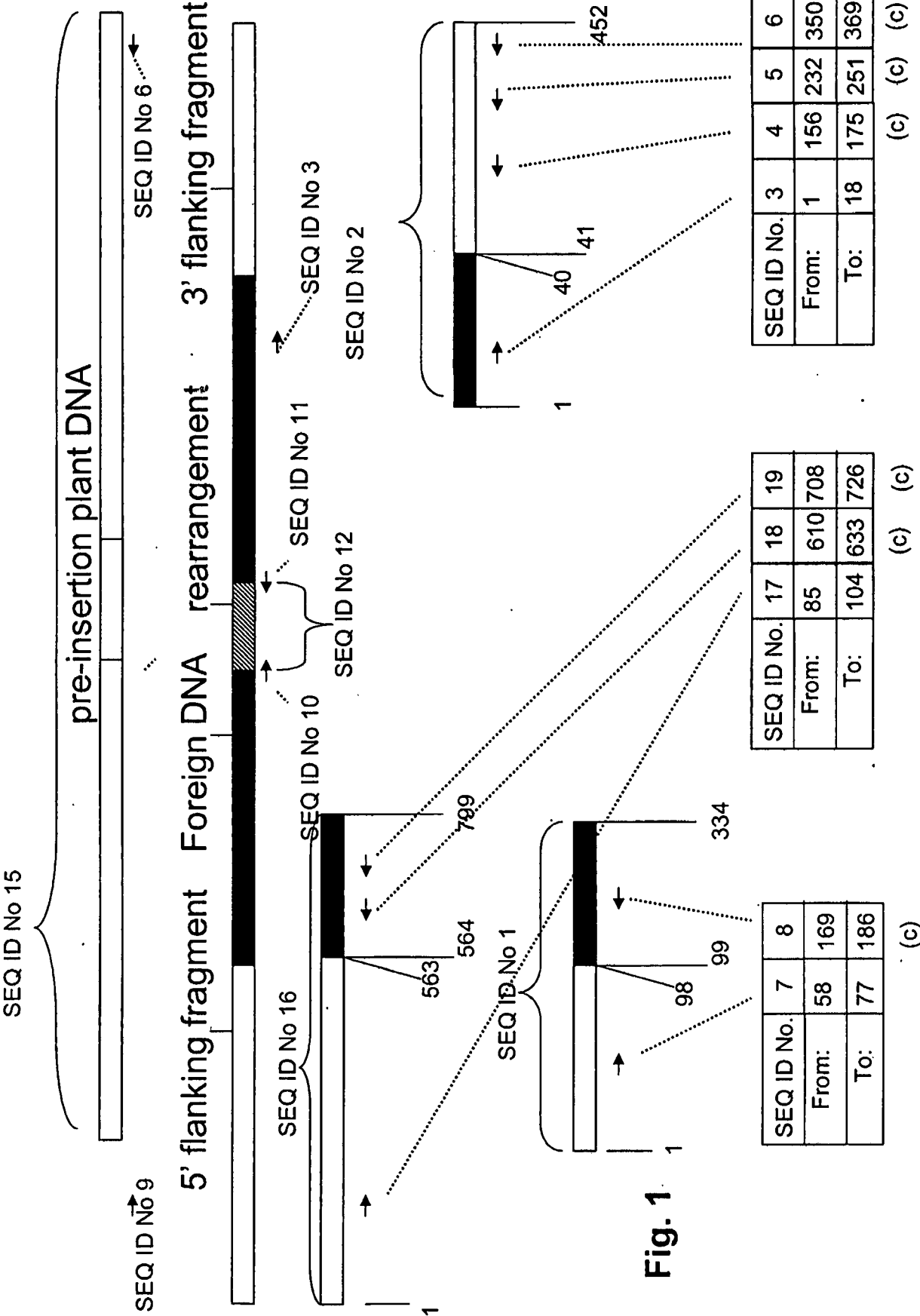


Fig. 2

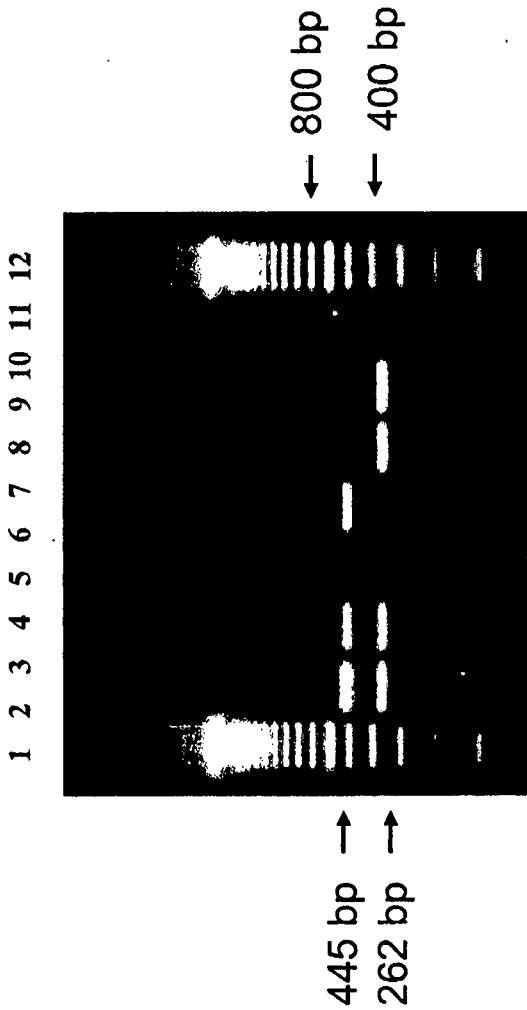
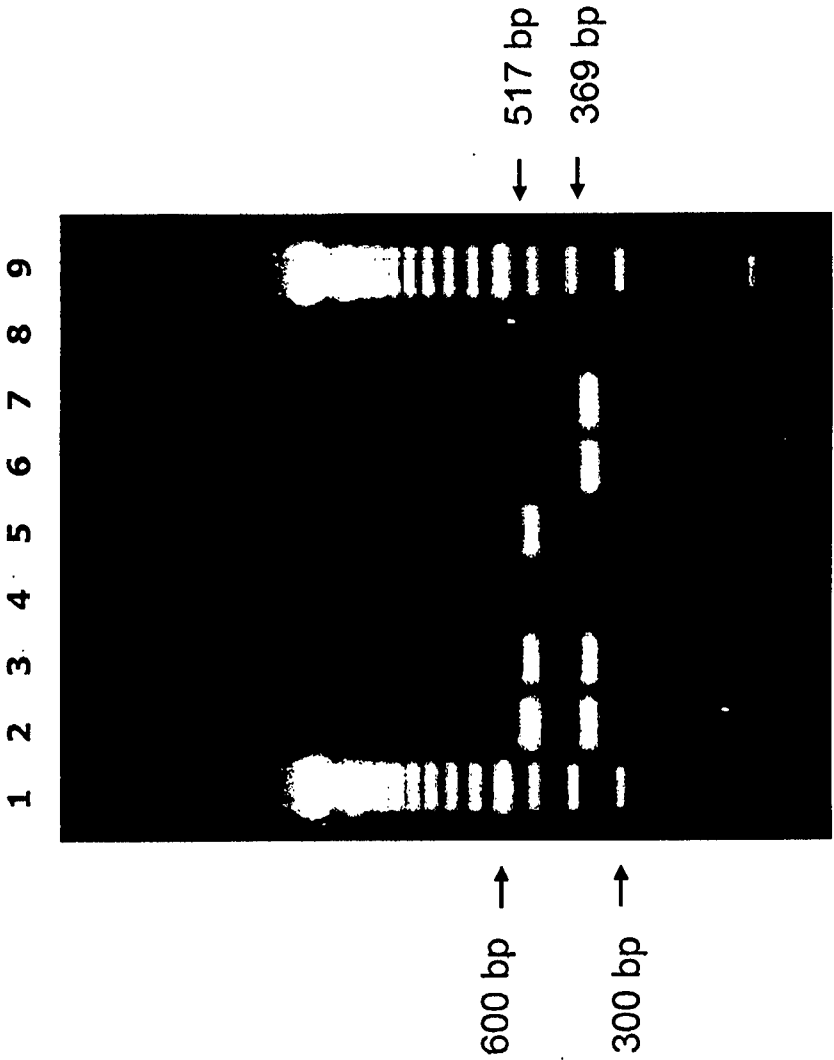


Fig. 3





**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
**TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS**

PATENTE DE INVENCION \_\_\_\_ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD \_\_\_\_ DISEÑO INDUSTRIAL \_\_\_\_

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **BAYER BIOSCIENCE N.V.**

(72) Inventor(es) **LINDA TROLINDER, SOFIE MOENS, DIMITRI PAELINCK, VEERLE HABEX, HANS VAN HERCK**

(74) Apoderado: **DR. LUIS PATIÑO LEYVA**

| (30) Prioridad | (31) N° Prioridad | (32) Fecha | (33) País |
|----------------|-------------------|------------|-----------|
|                | 07075263.9        | 05/04/2007 | EP        |
|                | 60/923.142        | 12/04/2007 | US        |
|                | 07075299.3        | 23/04/2007 | EP        |

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(96) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **16/10/2008**

Fecha de presentación de la solicitud: **31/03/2008**

N° publicación: **WO 2008/122406 A1**

N° de solicitud **PCT/EP2008/002667**

(54) Título: **PLANTAS DE ALGODÓN CON TOLERANCIA A INSECTOS Y METODOS PARA IDENTIFICARLAS**

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT****NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER BIOSCIENCE N.V.  
Technologiepark 38  
B-9052 Gent  
BELGIQUE

|                                                                          |                               |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>21 July 2009 (21.07.2009)            | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b> |
| Applicant's or agent's file reference<br>BCS06-2011                      |                               |
| International application No.<br>PCT/EP2008/002667                       |                               |
| International filing date (day/month/year)<br>31 March 2008 (31.03.2008) |                               |

1. The following indications appeared on record concerning:

- ☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address

MOENS, Sofie  
Jagerstraat 1  
B-9810 Eke  
Belgium

State of Nationality

BE

State of Residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

- ☐ the person      ☐ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address

MOENS, Sofie  
Oscar Declercqstraat 62  
B-9750 Zingem  
Belgium

State of Nationality

BE

State of Residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

- ☒ the receiving Office      ☐ the International Preliminary Examining Authority  
☐ the International Searching Authority      ☒ the designated Offices concerned  
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search      ☐ the elected Offices concerned  
☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sontag Frederic

Facsimile No. +41 22 338 89 70

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER BIOSCIENCE N.V.  
Technologiepark 38  
B-9052 Gent  
BELGIQUE

|                                                               |                                                                          |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>21 July 2009 (21.07.2009) | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>                                            |
| Applicant's or agent's file reference<br>BCS06-2011           |                                                                          |
| International application No.<br>PCT/EP2008/002667            | International filing date (day/month/year)<br>31 March 2008 (31.03.2008) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
                 
 ☒ the inventor
                 
 ☐ the agent
                 
 ☐ the common representative

Name and Address

VAN HERCK, Hans  
Cypriaan de Rorestraat 6  
B-2800 Mechelen  
Belgium

State of Nationality

BE

State of Residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
                 
 ☐ the name
                 
 ☒ the address
                 
 ☐ the nationality
                 
 ☐ the residence

Name and Address

VAN HERCK, Hans  
Salphensebaan 16  
B-2390 Malle  
Belgium

State of Nationality

BE

State of Residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office  
☐ the International Searching Authority  
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search

☐ the International Preliminary Examining Authority  
☒ the designated Offices concerned  
☐ the elected Offices concerned  
☐ other:
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sontag Frederic

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION  
DEL TRÁMITE**

|                                                                                     | USUARIO | RADICADOR |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| <b>PATENTE DE INVENCION ( X ) MODELO DE UTILIDAD ( )</b>                            | ( X )   | ( )       |
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente                         | ( X )   | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | ( X )   | ( )       |
| - Descripción de la invención                                                       | ( X )   | ( )       |
| - Dibujos de ser estos pertinentes                                                  | ( X )   | ( )       |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     | ( X )   | ( )       |

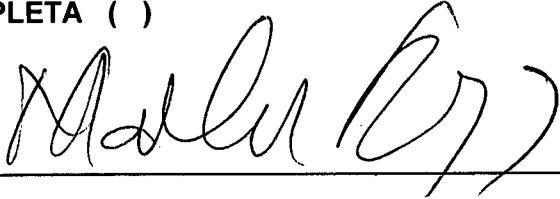
**COMPLETA (X) INCOMPLETA ( )**

|                                                                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| <b>DISEÑO INDUSTRIAL ( )</b>                                                                                |     |     |
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial                                            | ( ) | ( ) |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         | ( ) | ( ) |
| - Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño | ( ) | ( ) |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             | ( ) | ( ) |

**COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )**

|                                                                                     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| <b>EZQUEMA DE TRAZADO ( )</b>                                                       |     |     |
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial                    | ( ) | ( ) |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | ( ) | ( ) |
| - Representación gráfica del Esquema de Trazado                                     | ( ) | ( ) |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     | ( ) | ( ) |

**COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )**

Firma responsable: 

Fecha: \_\_\_\_\_



Bogotá,  
2020

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

142

Doctor(a)  
PATIÑO LEYVA LUIS

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 124408          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/EP2008/002667 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 05/11/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 |                   |

12531

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

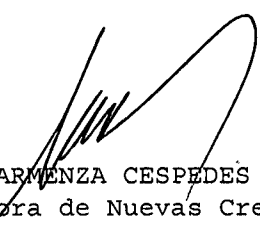
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 124408

143

  
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 13 NOV. 2009  
adpall

Al contestar favor indique el número  
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070  
Call Center 6513240. Línea 01800-910165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. Colombia