



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 261**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05809297 .4**
96 Fecha de presentación : **06.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1797201**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de vegetales en unas mezclas complejas.**

30 Prioridad: **08.10.2004 FR 04 10648**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2010

73 Titular/es: **Université Joseph Fourier (Grenoble 1)
Domaine Universitaire de St.Martin d'Hères
F-38041 Grenoble Cédex, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

72 Inventor/es: **Taberlet, Pierre;
Gielly, Ludovic y
Miquel, Christian, Philippe**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 343 261 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de vegetales en unas mezclas complejas.

5 La presente invención se refiere a unos oligonucleótidos y a su utilización como cebadores universales para la detección y la identificación de especies vegetales, en particular en unos sustratos complejos o degradados.

Se conocen diferentes métodos que permiten la identificación de vegetales basados en el análisis del genoma, pero ninguno permite por ahora trabajar sobre unos sustratos degradados y/o complejos.

10 Los métodos de huellas genéticas se basan así en el análisis del genoma completo. El objetivo de estos métodos es proporcionar una huella genética propia de cada individuo (identificación del individuo y no de la especie). Sin embargo, a pesar de que no es el objetivo inicial, pueden permitir asimismo en una cierta medida la identificación de la especie. Todos estos métodos necesitan la obtención de ADN de buena calidad (no degradado) y sin mezcla con
15 unos ADN exógenos (que proceden de otros organismos). Por esta razón, es imposible utilizar estos enfoques para la identificación de vegetales en unos sustratos degradados o complejos.

A título de ejemplo de método de huella genética, se pueden citar los métodos AFLP y DArT.

20 El método AFLP "Amplified Fragment Length Polymorphism" es actualmente muy utilizado al mismo tiempo en genética de las poblaciones y en cartografía genética (Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414; patente US nº 6.045.994). Se basa en una digestión/ligación del ADN genómico, seguida de dos amplificaciones sucesivas que utilizan unos cebadores PCR particulares de manera que se simplifica el
25 genoma para hacerlo analizable mediante electroforesis. Necesita ADN de muy buena calidad, y en cantidad suficiente (varias centenas de nanogramos de ADN en general). Es absolutamente imposible utilizar este enfoque de manera pertinente para el análisis de sustratos degradados y complejos.

El método DArT "Diversity Array Technology" se basa en un enfoque muy similar (digestión/ligación y después
30 amplificación), pero difiere por el método de análisis (hibridación) (Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29, e25; patente US nº 6.713.258). Es posible asimismo utilizar este enfoque sobre unos sustratos degradados y complejos.

35 Otros métodos se basan en la amplificación y en la secuenciación. Desde un punto de vista teórico, la secuenciación de una región homóloga suficientemente larga (varios centenares de pares de bases) posee el potencial para permitir la identificación de la especie en los vegetales. Dicha región debe estar encuadrada por unas zonas muy conservadas que permiten la concepción de cebadores universales para la amplificación. El ADN nuclear no es muy apropiado, debido a que su acceso es muy difícil, incluso imposible, en el caso de sustratos degradados. Sin embargo, en lo que se refiere
40 al ADN nuclear, los ITS (Internal Transcribed Spacer del ADN ribosómico) han sido utilizados para la detección y la identificación de vegetales. Unos cebadores universales han sido descritos en los hongos y ha resultado que funcionan asimismo en los vegetales (White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, en: *PCR protocols, a guide to methods and applications* (eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ), p. 315-322. Academic Press, San Diego, California). Por eso, esta región de
45 algunos centenares de pares de bases ha sido utilizada para efectuar unas filogenias entre especies parecidas en los vegetales (Baldwin BG (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1, 3-16; Gielly L, Yuan Y-M, Küpfer P, Taberlet P (1996) Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast trnL (UAA) intron
50 *versus* nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6, 460-466) y para identificar las especies (véase por ejemplo Linder C, Moore L, Jackson R (2000) A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology*, 9, 1549-1559 o la página web de la compañía "Bioprofiles": <http://www.bioprofiles.co.uk/>). Sin embargo, esta región adolece de ciertos inconvenientes. En primer lugar, es demasiado larga para ser utilizada en el caso de sustratos muy degradados, además se trata de secuencias nucleares ciertamente repetidas, pero en menor medida que las presentes en el ADN cloroplástico. En segundo lugar,
55 los cebadores pueden amplificar varios tipos de secuencia en el seno de una misma especie. Por último, los cebadores no son realmente universales y puede ser difícil obtener una amplificación en ciertas especies.

Por el contrario, los ADN mitocondrial y cloroplástico están presentes repetidos en gran medida en cada célula (varios centenares de copias). Resulta de ello que representan una diana para la amplificación mucho más accesible en
60 el caso de sustratos degradados. El ADN mitocondrial es sin embargo muy poco variable en los vegetales.

Así, varios artículos describen unos cebadores universales dirigidos a diferentes regiones del ADN cloroplástico (Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109; Demesure B, Sodji N, Petit RJ (1995) A set of universal
65 primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4, 129-131; Dumolin-Lapégue S, Pemonge M-H, Petit RJ (1996) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 5, 393-397; y Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8, 521-523).

Algunas de ellas han sido ampliamente utilizadas para amplificar y secuenciar unas regiones variables del ADN cloroplástico. Se trata principalmente de los cebadores c y d (Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109) que amplifican el intrón del gen del ARN de transferencia para la leucina, codón UAA (*trnL* UAA). Actualmente, varios millares de secuencias de este intrón están disponibles en las bases de datos públicas (GenBank). El intrón del gen *trnL* (UAA) es muy variable, pero posee asimismo unas partes conservadas, lo que se relaciona con el hecho de que puede constituir unas estructuras secundarias (Simón D, Fewer D, Friedl T, Bhattacharya D (2003) Phylogeny and self-splicing ability of the plastid tRNA-Leu group I intron. *Journal of Molecular Evolution*, 57, 710-720). Sin embargo, estos cebadores c y d amplifican unas regiones demasiado largas para ser utilizadas sobre unos sustratos degradados.

Otra solución para la identificación específica ha sido propuesta por Bobowski *et al.* (Bobowski B, Hole D, Wolf P, Bryant L (1999) Identification of roots of woody species using polymerase chain reaction (PCR) and restricted fragment length polymorphism (RFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8, 485-491): amplificación del gen *rbcL* con la ayuda de cebadores universales, y caracterización del producto de amplificación mediante digestión enzimática seguida de una migración sobre gel (el producto podría ser asimismo caracterizado mediante secuenciación directa).

Sin embargo, todos estos cebadores amplifican unas regiones demasiado largas para ser utilizadas sobre unos sustratos degradados. Es la razón por la que otros cebadores han sido definidos por Poinar *et al.* (Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S (1998) Molecular coproscopy: Dung and diet of the extinct ground sloth *Nothotheriops shastensis*. *Science*, 281, 402-406) con el fin de amplificar unos fragmentos más cortos, compatibles con el análisis de restos "fósiles" (coprolitos de un perezoso desaparecido en este caso). Estos autores han concebido unos cebadores en el gen cloroplástico *rbcL*. Los fragmentos amplificados permiten justo identificar la familia, y estos cebadores no son realmente universales. A pesar de ello, en ausencia de alternativa, Willerslev *et al.* (Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brand TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 300, 791-795) han utilizado los cebadores de Poinar *et al.* (Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S (1998) Molecular coproscopy: Dung and diet of the extinct ground sloth *Nothotheriops shastensis*. *Science*, 281, 402-406) en su análisis del ADN extraído del "permafrost" (suelo helado). Su objetivo era caracterizar los ADN vegetales todavía presentes en el suelo. También en este caso, sólo se han podido identificar las familias.

Para resumir, o bien los sistemas propuestos hasta ahora se basan en unas secuencias demasiado largas para ser eficaces en el análisis de sustratos degradados, o bien el nivel de variabilidad de los fragmentos cortos no es suficientemente elevado para ser útil realmente en la identificación de los vegetales. Las regiones al mismo tiempo suficientemente cortas y suficientemente variables son raras y ninguna ha sido caracterizada.

Para remediar los inconvenientes del estado de la técnica, la presente invención propone nuevos oligonucleótidos y su utilización como cebadores universales para la detección y la identificación de especies vegetales.

Los oligonucleótidos de la presente invención permiten amplificar una región muy corta pero asimismo muy variable del intrón del gen *trnL* (UAA) del ADN cloroplástico.

Una primera ventaja de la presente invención es que los oligonucleótidos y los métodos de la presente invención permiten la detección y la identificación de los vegetales en unos sustratos complejos o degradados tales como unos sustratos transformados (por el calor, la liofilización, etc.) puesto que la región amplificada es al mismo tiempo corta y muy variable.

Otra ventaja de la presente invención es que la región amplificada no sólo es muy variable entre especies vegetales sino que posee asimismo unas regiones flanqueantes muy conservadas que permiten la amplificación de la región de interés en diferentes especies vegetales con la ayuda de cebadores universales.

Otra ventaja de la presente invención es que el intrón del gen *trnL* (UAA) es una de las pocas secuencias cloroplásticas para la cual están disponibles varios millares de secuencias en las bases de datos tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El análisis de la región variable amplificada con la ayuda de los cebadores universales permite por lo tanto identificar la especie vegetal correspondiente haciendo referencia a las secuencias disponibles en las bases de datos.

Unos métodos que permiten la identificación de vegetales en unos sustratos complejos o degradados presentan un gran interés. Se citarán, por ejemplo, las aplicaciones en la industria agroalimentaria en la que, por ejemplo, el respeto de los criterios de trazabilidad impone el desarrollo de nuevos métodos de análisis que permiten identificar la composición detallada en especies vegetales de preparaciones alimenticias.

Descripción de la invención

Un primer objeto de la presente invención es un par de oligonucleótidos en el que el primer oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 68, y el segundo oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 69 en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación selectiva de una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* del tabaco cuya secuencia se representa en la SEC ID nº 3.

ES 2 343 261 T3

Otro objeto de la presente invención es un par de oligonucleótidos en el que el primer oligonucleótido se híbrida a la secuencia de la SEC ID nº 68 y el segundo oligonucleótido se híbrida a la secuencia de la SEC ID nº 69, en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación selectiva de una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales cuya secuencia se representa en las SEC ID nº 24 a nº 67.

Típicamente, la hibridación se efectúa a 55°C en un tampón de amplificación que comprende MgCl_2 2 mM.

En un modo de realización preferido de la invención, el primer oligonucleótido se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 1, nº 4 a nº 15 y el segundo oligonucleótido se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 2, nº 16 a nº 23.

La invención se refiere asimismo a unos oligonucleótidos cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por la SEC ID nº 1, la SEC ID nº 2, las SEC ID nº 4 a nº 15 y las SEC ID nº 16 a nº 23.

La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.

En un modo de realización ventajoso de la invención, los pares de oligonucleótidos, los oligonucleótidos y los polinucleótidos según la invención son inmovilizados sobre un soporte sólido.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de amplificación de una región variable del ADN cloroplástico de los vegetales que comprende las etapas siguientes:

- a) disponer de una muestra que comprende ADN genómico vegetal;
- b) amplificar una región variable del ADN cloroplástico con un par de oligonucleótidos según la invención o con por lo menos un oligonucleótido según la invención.

En un modo de realización particular, la región variable del ADN cloroplástico amplificada en la etapa b) es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.

En otro modo de realización particular, el procedimiento de amplificación de una región variable del ADN cloroplástico de los vegetales según la invención comprende una etapa de extracción del ADN cloroplástico antes de la etapa de amplificación b).

Preferentemente, se amplifica la región variable del ADN cloroplástico mediante una reacción de amplificación en cadena por polimerasa (PCR).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección de una especie vegetal en una muestra que comprende las etapas siguientes:

- a) disponer de una muestra susceptible de contener una especie vegetal;
- b) efectuar una reacción de amplificación con un par de oligonucleótidos según la invención, o con por lo menos un oligonucleótido según la invención;
- c) detectar la obtención de un producto de amplificación que atestigua la presencia de una especie vegetal en la muestra.

En un modo de realización particular, el producto de amplificación es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.

En otro modo de realización, el procedimiento de detección de una especie vegetal en una muestra según la invención comprende una etapa de extracción del ADN antes de la etapa de amplificación b).

Preferentemente, se efectúa una reacción de amplificación en cadena por polimerasa (PCR).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra que comprende las etapas siguientes:

- a) disponer de una muestra susceptible de contener una especie vegetal;
- b) efectuar una reacción de amplificación con un par de oligonucleótidos según la invención, o con por lo menos un oligonucleótido según la invención;
- c) analizar el producto de amplificación obtenido para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

ES 2 343 261 T3

En un modo de realización particular, el producto de amplificación es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.

5 En un modo de realización, en la etapa c), se determina la secuencia del producto de amplificación para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

En otro modo de realización, en la etapa c), se hibrida el producto de amplificación con por lo menos una secuencia vegetal de referencia para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

10 Preferentemente, la secuencia de referencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 3 y nº 24 a nº 67.

En otro modo de realización, en la etapa c), se analiza el producto de amplificación mediante electroforesis para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

15 La invención se refiere asimismo a la utilización de la región variable del gen del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales que corresponde a las posiciones 49425 a 49466 del ADN cloroplástico del tabaco para la detección y la identificación de especies vegetales.

20 En un modo de realización particular, la región variable del gen del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.

La presente invención se refiere a unos polinucleótidos derivados de dos regiones muy conservadas del ADN cloroplástico de los vegetales. Estos polinucleótidos derivados de regiones cuya secuencia está muy conservada en todo el reino vegetal, en particular en los angiospermas y los gimnospermas, pueden ser utilizados como cebadores universales para la amplificación o la secuenciación del ADN de cloroplasto de los vegetales.

Además, se ha descubierto que, de manera particularmente ventajosa, las regiones conservadas de las cuales se derivan los polinucleótidos de la presente invención flanquean una región al mismo tiempo corta y muy variable del ADN cloroplástico. La variabilidad de esta región entre especies vegetales puede ser utilizada por lo tanto para distinguir e identificar las especies vegetales.

Según la presente invención, se entiende por el término “polinucleótido” una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementaria o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN o ARN. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular de ADN bicatenario.

El término “polinucleótido” designa asimismo los oligonucleótidos y los polinucleótidos modificados. Típicamente, los polinucleótidos modificados pueden contener unos nucleótidos modificados. Alternativamente, estos polinucleótidos modificados son unos polinucleótidos conjugados con unos agentes reactivos de unión (biotina por ejemplo) o con unos agentes reactivos marcados (marcadores fluorescentes por ejemplo). Clásicamente, los agentes reactivos de unión o los agentes reactivos marcados conjugados con los polinucleótidos facilitan la purificación o la detección de estos polinucleótidos.

Según la invención, se entiende por el término “oligonucleótido”, un polinucleótido constituido por una secuencia corta de nucleótidos, cuyo número varía de una hasta algunas decenas, pero generalmente es inferior a 100 bases. El término “polinucleótido” designa por lo tanto asimismo los oligonucleótidos.

Se entiende mediante el término “cebador”, una secuencia corta de oligonucleótidos que, hibridada con una matriz de ácido nucleico, permite que una polimerasa inicie la síntesis de una nueva hebra del ADN. La hebra producida a partir del cebador es complementaria a la hebra utilizada como matriz.

Ventajosamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser inmovilizados sobre un soporte sólido. Se conocen los soportes sólidos adaptados a la inmovilización de polinucleótidos o de oligonucleótidos en particular para la fabricación de chips de ADN. Existe numerosas variedades de chips de ADN, que se distinguen por el tipo de soporte utilizado, la naturaleza, la densidad y el modo de fijación o de síntesis de las secuencias nucleotídicas sobre el soporte, y las condiciones de lectura. Estas técnicas son conocidas por el experto en la materia. Se entiende asimismo mediante la expresión “soporte sólido”, unos soportes de tipo microesferas tales como los productos FLEXMAP™ de la compañía LUMINEX® y los productos Liquid-Chip™ de la compañía QIAGEN®.

De manera general, los polinucleótidos de la presente invención se aíslan o se purifican de su entorno natural. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar mediante las técnicas habituales de biología molecular tales como las descritas por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o mediante síntesis química.

65 Mediante la expresión “especie vegetal”, se entiende cualquier organismo vivo que forma parte del reino vegetal.

La invención se refiere asimismo a un par de oligonucleótidos en el que el primer oligonucleótido se hibrida a una primera región muy conservada del ADN cloroplástico, y el segundo oligonucleótido se hibrida a una segunda

región muy conservada del ADN cloroplástico en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación selectiva de una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales. La secuencia de la primera región conservada corresponde a la secuencia del cebador g (SEC ID n°1) y de su secuencia complementaria (SEC ID n°68). La secuencia de la segunda región conservada corresponde a la secuencia del cebador h (SEC ID n° 2) y de su secuencia complementaria (SEC ID n° 69).

En el tabaco, que se puede utilizar como especie vegetal de referencia, los pares de oligonucleótidos de la presente invención permiten la amplificación selectiva de la región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* del tabaco cuya secuencia se representa en la SEC ID n° 3.

Las secuencias de los pares de oligonucleótidos de la presente invención se seleccionan de tal manera que el primer oligonucleótido se hibrida a la SEC ID n° 68 y el segundo oligonucleótido se hibrida a la SEC ID n° 69 en unas condiciones de astringencia suficientes para permitir la amplificación selectiva de la región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales.

El experto en la materia conoce las reacciones de amplificación de ADN y las condiciones de astringencia que permiten una amplificación selectiva y en particular las condiciones de temperatura de hibridación y de composición del tampón de hibridación.

El experto en la materia podrá por lo tanto definir fácilmente diferentes variantes de los cebadores g (SEC ID n° 1) y h (SEC ID n° 2) utilizando unas técnicas habituales. Estas variantes se hibridan a las secuencias de referencia y permiten la amplificación selectiva de la región variable de interés del ADN cloroplástico. Algunas variantes posibles del cebador g están representadas en las SEC ID n° 4 a n° 15 y algunas variantes posibles del cebador h están representadas en las SEC ID n° 16 a n° 23. Habitualmente, las variaciones de secuencia son más bien introducidas en el extremo 5' de los oligonucleótidos para no comprometer la reacción de amplificación. Habitualmente, se pueden introducir por ejemplo unos nucleótidos suplementarios en el extremo 5' de los oligonucleótidos.

Por el término "hibridarse" se entiende según la invención, las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intenso que el de la interacción de las demás secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son bien conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior en por lo menos 5°C a la T_m de la secuencia de referencia a un pH determinado y para una fuerza iónica determinada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los lavados se realizan, por ejemplo, sucesivamente a baja astringencia en un tampón 2X SSC, 0,1% de SDS, a media astringencia en un tampón de 0,5X SSC, 0,1% de SDS y a fuerte astringencia en un tampón de 0,1X SSC, 0,1% de SDS. La hibridación se puede efectuar evidentemente según otros métodos habituales conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989).

Preferentemente, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva a un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En la presente invención, la función de los polinucleótidos es la amplificación de una región variable del ADN cloroplástico.

Por el término "astringencia", se entiende el rigor de las condiciones de realización (en particular la temperatura y la fuerza iónica) en las que se desarrolla una hibridación molecular.

Por el término "amplificación", se entiende cualquier amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia definida de ADN.

Habitualmente, la amplificación comprende unos ciclos sucesivos (generalmente de 20 a 40) de amplificación, compuestos a su vez por tres fases: después de una etapa de desnaturalización (separación de las dos hebras de la doble hélice) del ADN, el posicionamiento de los cebadores (secuencias cortas de oligonucleótidos seleccionadas específicamente) frente a sus secuencias complementarias, sobre las hebras de ADN, y su fijación sobre estas dianas constituye la segunda fase del procedimiento (hibridación). La fase de extensión hace intervenir una enzima, la ADN polimerasa, que sintetiza, a partir de los cebadores, la hebra complementaria de la que ha servido de matriz. La repetición de este ciclo conduce a la amplificación exponencial del fragmento de ADN.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de amplificación de una región variable del ADN cloroplástico de los vegetales con la ayuda de los polinucleótidos, de los oligonucleótidos y/o de los pares de oligonucleótidos según la invención.

Los procedimientos de amplificación de secuencia de ADN son bien conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía. Se citará la reacción de amplificación en cadena por polimerasa (PCR) pero se puede utilizar cualquier tipo de reacción de amplificación en los procedimientos según la invención.

Puesto que las secuencias de los polinucleótidos según la presente invención están altamente conservadas en todo el reino vegetal, estos polinucleótidos se pueden utilizar en la detección de especies vegetales.

Por el término “detección” se entiende la determinación de la presencia de una especie vegetal en una muestra pero también la medición y la cuantificación de una especie vegetal en una muestra.

Con la ayuda de los polinucleótidos de la presente invención, es posible ahora amplificar una región muy variable del ADN de cloroplasto. La secuencia de esta región difiere de una especie vegetal a otra de tal manera que cada secuencia es específica de una especie o de un pequeño número de especies muy parecidas. Una vez que la región variable ha sido amplificada, su secuencia se analiza para identificar la especie vegetal. El análisis se puede efectuar mediante diferentes métodos bien conocidos por el experto en la materia. Puede tratarse de una secuenciación completa o parcial seguida de una comparación con unas secuencias conocidas. Alternativamente, puede tratarse de la determinación del grado de homología con unas secuencias conocidas (secuencias de referencia) recurriendo a unas técnicas de hibridación por ejemplo. Otra posibilidad es el análisis por electroforesis y después la comparación con unas secuencias de referencia. Los procedimientos según la presente invención permiten por lo tanto determinar la identidad de una especie vegetal presente en una muestra.

Por el término “muestra” en un procedimiento de análisis, se entiende la sustancia a medir. En la presente invención, la muestra comprende habitualmente una sustancia orgánica susceptible de contener una especie vegetal. De manera ventajosa, los procedimientos de la presente invención permiten el análisis de muestras constituidas por materia en descomposición o degradada por calentamiento, liofilización, congelación o por cualquier otro tratamiento que provoca una degradación del ADN. Los procedimientos de la presente invención permiten así la detección de especies vegetales en unos alimentos transformados por ejemplo. Otra aplicación de los procedimientos de la presente invención es la detección de especies vegetales en unos sustratos que proceden de suelos helados (“permafrost”) o en restos fosilizados.

La muestra puede sufrir un tratamiento antes de efectuar la reacción de amplificación con la ayuda de los polinucleótidos de la invención. Típicamente, puede tratarse de una etapa de extracción del ADN según unas técnicas habituales bien conocidas por el experto en la materia.

Por el término “extracción”, se entiende la operación que consiste en extraer una sustancia de un medio con la ayuda de un disolvente por ejemplo o mediante cualquier otro método fisicoquímico.

La invención se refiere asimismo a la utilización de la región variable del gen del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales que corresponde a las posiciones 49425 hasta 49466 del ADN cloroplástico del tabaco para la detección y la identificación de especies vegetales.

A partir de la secuencia de referencia del tabaco (Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Sinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Ment B, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4, 110-147) y de las posiciones de la región variable sobre esta secuencia de referencia, el experto en la materia puede identificar las secuencias correspondientes en otras especies vegetales con la ayuda de técnicas habituales.

Descripción del listado de secuencias

SEC ID n° 1: Cebador g.

SEC ID n° 2: Cebador h.

SEC ID n° 3: Secuencia variable amplificada de *Nicotiana tabacum*.

SEC ID n° 4 a n° 15: Variantes del cebador g.

SEC ID n° 16 a n° 23: Variantes del cebador h.

SEC ID n° 24 a n° 67: Secuencia variable amplificada de diferentes especies vegetales.

SEC ID n° 68: Secuencia de la región complementaria al cebador g.

SEC ID n° 69: Secuencia de la región complementaria al cebador h.

Descripción de las figuras

Figura 1: Localización de la zona estudiada y de los cebadores universales sobre la secuencia del ADN cloroplástico de tabaco (Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Sinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Ment B, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco

chloroplast genome. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4, 110-147); c y d representan los cebadores definidos por Taberlet *et al.* (Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109), g y h representan los cebadores universales definidos en el ámbito de la presente solicitud de patente.

Figura 2: Ejemplos de amplificaciones obtenidas con los cebadores g y h, a partir de extractos de ADN que proceden de sustratos degradados. 1, patata cocida; 2, pasta cocida; 3 y 4, sopa en polvo liofilizada; 5, control negativo de la extracción (reacción de amplificación a partir de una extracción sin sustrato); 6, control negativo de amplificación (reacción de amplificación sin extracto de ADN); 7, control positivo (ADN de *Cyclamen*); M, marcador de peso molecular. Es interesante observar que el fragmento que corresponde a la patata cocida (79 pb) es más corto que el que corresponde a la pasta cocida y por lo tanto al trigo (92 pb).

Figura 3: Experimento que compara la eficacia de los cebadores c-d (pistas 1 a 4) y g-h (pistas 5 a 8) para la amplificación de ADN extraído de sustrato degradado (miga de pan). M, marcador de peso molecular. 1 y 5, ADN extraído de miga de pan. 2 y 6, control de extracción. 3 y 7, control de amplificación. 4 y 8, control positivo.

Figura 4: La figura 4 representa, en forma esquemática, la gestión general que se podría aplicar para identificar unos vegetales utilizando ciertos modos de realización de la invención. La primera etapa consiste en extraer el ADN a partir del sustrato. La segunda etapa es la amplificación del extracto con la ayuda del método PCR (Polymerase Chain Reaction). El análisis del producto de amplificación constituye la tercera etapa. Se presentan cuatro soluciones alternativas. La primera posibilidad de análisis se refiere sólo a los sustratos simples (una sola especie vegetal presente) y consiste en secuenciar directamente el producto de amplificación con los métodos habituales. Las segunda y tercera posibilidades se reservan para los sustratos complejos que contienen una mezcla de vegetales. El análisis se efectúa o bien después de la clonación del producto de amplificación y después secuenciación de varios clones (véase la tabla 4 para un ejemplo de resultado), o bien después de la hibridación sobre un soporte con las secuencias dianas potenciales (método no ilustrado, que implica el conocimiento previo de las especies susceptibles de estar presentes). Una última posibilidad de análisis consiste en caracterizar los productos de amplificación mediante electroforesis (o bien desnaturalizante, o bien no desnaturalizante de tipo SSCP). Esta última posibilidad puede ser utilizada asimismo para unos sustratos simples (una sola especie vegetal presente) o para unos sustratos que contienen una mezcla.

En lo que se refiere al análisis mediante secuenciación directa, las condiciones PCR utilizadas para la detección mediante electroforesis son las siguientes:

Ejemplos

1) Secuenciación directa

En lo que se refiere al análisis mediante secuenciación directa, las condiciones de PCR utilizadas para la detección mediante electroforesis son las siguientes:

a) Condiciones de amplificación para la detección con cebador g marcado por un fluorocromo

- (i) Volumen final: 25 μ l
- (ii) $MgCl_2$: 2 mM
- (iii) dNTP: 0,2 mM cada uno
- (iv) Cebadores: 1 μ M cada uno
- (v) Taq polimerasa (Amplitaq Gold, Perkin Elmer): 1 unidad
- (vi) BSA: 0,2 μ l por tubo
- (vii) Volumen de extracto de ADN utilizado: 2,5 μ l
- (viii) Desnaturalización inicial de 10 mn a 95°C
- (ix) Número de ciclos: 35 (a ajustar en función del extracto)
- (x) Desnaturalización: 30 s a 95°C, Hibridación: 30 s a 55°C, ninguna etapa de alargamiento.

Estas condiciones prevén reducir el artefacto “+A” que molesta la interpretación de los resultados.

b) Condiciones de amplificación para la detección con cebador h marcado por un fluorocromo

- (i) Volumen final: 25 μ l
- (ii) $MgCl_2$: 2 mM
- (iii) dNTP: 0,2 mM cada uno
- (iv) Cebadores: 1 μ M cada uno
- (v) Taq polimerasa (Amplitaq Gold, Perkin Elmer): 1 unidad
- (vi) BSA: 0,2 μ l por tubo
- (vii) Volumen de extracto de ADN utilizado: 2,5 μ l
- (viii) Desnaturalización inicial de 10 mn a 95°C
- (ix) Número de ciclos: 35 (a ajustar en función del extracto)
- (x) Desnaturalización: 30 s a 95°C, Hibridación: 30 s a 55°C, Elongación: 60 s a 72°C
- (xi) Elongación final: 90 minutos a 72°C.

Estas condiciones prevén favorecer el artefacto “+A” para facilitar la interpretación de los resultados.

2) Cebadores universales

La tabla 1 representa las secuencias de los cebadores universales utilizados para amplificar la región variable del ADN cloroplástico que permite identificar los vegetales después de la extracción y de la amplificación a partir de sustratos degradados. Las posiciones de la base 3' en la secuencia de referencia del tabaco se indican en la tabla (Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Sinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Ment B, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. Plant Molecular Biology Reporter, 4, 110-147).

TABLA 1

Cebador	Secuencia	Posición de la base 3' en la secuencia del tabaco
g	5'GGGCAATCCTGAGCCAA3'	49425
h	5'CCATTGAGTCTCTGCACCTATC3'	49466

La alineación de estas dos regiones flanqueantes muestra (tablas 1 y 2) que es posible definir unos cebadores que son universales en los vegetales superiores (angiospermas y gimnospermas). Después de haber alineado varios centenares de secuencias de intrones del *trnL* (UAA), los pocas variaciones de secuencias observadas a nivel de la zona en la que los inventores han definido los cebadores demuestran que los cebadores son realmente universales (véase la tabla 2). En efecto, la diferencia observada con la secuencia del cebador implica como mucho un solo desapareamiento que no afecta en ningún caso a las tres últimas bases del lado 3' del cebador. Por eso, se puede predecir con certeza que los cebadores g y h son universales.

3) Variabilidad de la región amplificada

La tabla 2 muestra las variaciones de la zona amplificada por los cebadores g y h para diferentes especies vegetales que entran en la composición de los alimentos (véase asimismo la tabla 3). Estas secuencias han sido o bien importadas de GenBank (base de datos pública de secuencia de ADN) o bien han sido realizadas en laboratorio.

Dos regiones muy conservadas encuadran una parte muy variable de una longitud de aproximadamente 20 a 100 pares de bases (figura 1). Dicha región representa por lo tanto la diana ideal para una identificación de los vegetales a partir de sustratos degradados (en estas condiciones frecuentemente resulta difícil obtener unos productos de amplificación para unos fragmentos de una longitud superior a 120 pares de bases). Los inventores no han encontrado ninguna otra región que responda a estos criterios. Parece por lo tanto que el sistema que los inventores proponen es único.

La tabla 2 representa la alineación de secuencias que muestran por un lado la zona en la que se han definido los cebadores universales, y por otro lado la variabilidad de la región amplificada. Los nucleótidos subrayados en las regiones que corresponden a los cebadores indican los desapareamientos con los cebadores universales g y h. En lo que se refiere a la región amplificada, los subrayados indican unas secuencias idénticas.

Tabla 2

<u>Nombre científico</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>g</i></u>	<u>Secuencia de la región amplificada</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>h</i></u>
<i>Theobroa cacao</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTATTATTTTATTATTTACGAAACTA AACAAAGGTTTCAGCAAGCGAGATAATA AAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Beta vulgaris</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	CTCCTTTTTCAAAAGAAAAAATAAGG ATTCCGAAACAAAGATAAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA AGG
<i>Castanea sativa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTATTTTACGAAACAAATAAGGTT CAGAAGAAAGCGAGATAAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Cannabis sativa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGGTTTCTGAAAAACAAACAGGATT CAGAAAGCAATAATAAAAAAGATAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Cicer arietinum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGCTTTCGGAAAAACAAACAAAAA GTTTCAGAAAGTTAAATCAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Saccharum officinatum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCCCTTTTGTGAAAAACAAAGTGTTTC TCAAACTAGAACCCAAAGGAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Asparagus officinalis</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCTTTATGTTTAGAAAAACAAAGGTTTT AATTTAAAACTAGAAAGAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Triticum aestivum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGIGTTTTGAGAAAAACAAAGGGTTTC TCGAACTAGATAACAAAGGAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Secale cereale</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGIGTTTTGAGAAAAACAAAGGGTTTC TCGAACTAGATAACAAAGGAA.AAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Oryza sativa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCATGTTTTGAGAAAAACAAAGCGTTCT CGAACTAGAACCCAAAGGAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Panicum miliaceum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCCCTTTTGTGAAAAACAAAGTGTTCT CAAA	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Ribes aureum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGTTTTACAAAACAAACACAAAGT TCACAAAGAGAGAATA.AAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Fragaria vesca</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCCGTTTTATGAAAAACAAACAGGTT TCAGAAAGCGAGATAATAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG

Nombre científico	Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>q</i>	Secuencia de la región amplificada	Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>h</i>
<i>Citrus paradisi</i>	GGGTAATCCTGAGCCAA	ATCCTCTTCTCTTTTCCCA.AGAACAAACAG GGTTCAGAAAGCGAAAAGGGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA
<i>Triphasia trifolia</i>	GGGTAATCCTGAGCCAA	ATCCTCTTCTCTTTTCCCA.AGAACAAACAG GGTTCAGAAAGCGAAAAGGGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Vitis vinifera</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGTTTTCCGAAAACAACCAAGGGTT CAGAAAACGATAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Prunus persica</i>	GGGCGATCCTGAGCCAA	ATCCTGTTTTATTAAACAACAAGGGTT TCTAAACCGAGATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Prunus armeriana</i>	GGGCGATCCTGAGCCAA	ATCCTGTTTTATTAAACAACAAGGGTT CATAAACCGAGATAAAAA AG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Prunus cerasus</i>	GGGCGATCCTGAGCCAA	TTACAAACAAGGGATCCCTGTTTTAAAAAT TCA.TAAACCGAGATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Actinidia chinensis</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTTTTTTCGAAAACAACAAGATT CAGAAAGCGAAAATAAACAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Zea mais</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTTTTTTGAAAACAAGTGTTCTC AACTAGAACCCAAAGGAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Pisum sativum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTTCTTCTGAAAACAATAAAAGTT CAGAAAGTGAAAATCAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCCGTTTTCTGAAAAAAGAAAAATTC AGAAAGTGATAATAAAAAAGG	GATAGGTGCAGAGACTC IA TGG
<i>Sorghum halepense</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCACTTTTTTCAAAAAAGTGTTCTC AACTAGAACCCAAAGGAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Cynara cardunculus</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCACGTTTTCCGAAACTAAACAAGGTT CAGAAAGCGAAAATCAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTC G ATGG
<i>Arctium lappa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCACGTTTTCCGAAAAACAACAAGGTT CAGAAAGCGAAAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTC G ATGG
<i>Lactuca sativa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCACGTTTTCCGAAAAACAACAAGGTT CAGAAAGCGAAAATCAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTC G ATGG
<i>Helianthus annuus</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCACGTTTTCCGAAAAACAACAAGGTT CAGAAAGCGAAAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTC G ATGG
<i>Ficus carica</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGGTTTTCTGAAAAACAACAAGGTT TCAGAAAGCGGATAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG

<u>Nombre científico</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador q</u>	<u>Secuencia de la región amplificada</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador h</u>
<i>Humulus lupulus</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGGTTTTCTGAAAAACAAAGGATT CAGAAAGCAATAATAAGGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Avena sativa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGTGTTTTGAGAGGGGTTCTCGA ACTAGAATACAAAGGAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Nasturtium officinale</i>	GGGCAATCCTG, AGCCAA	ATCCTTGTTTACGCAAAACAAACCGAGTT TAGAAAGCGAGAAAAAGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Armoracia rusticana</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTTGTTTACGCGA.ACAAACCTGAGT TTAGAAAGCGAGATAAAGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Hordeum vulgare</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCGTGTTTTGAGAAAGGATTCTCGAA CTAGAATACAAAGGAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Anthriscus cerefolium</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTA ¹ TITII ¹ CCAAAAACAAACAAAGGC CCAGAAGGTGAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Allium cepa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCTTCTTTTTTGAAAAACAAGGGTTTAA AAAAGAGAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Allium porum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCTTTATTTTTTGAAAAACAAGGGTTTA AAAAGAGAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Carum petroselinum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTATTTTCCAAAAACAAACAAAGGCC CAGAAGGTGAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Solanum tuberosum</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGTITTTCTGAAAAACAAACAAAGGIT CAGAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Solanum lycopersicum</i>	GGGCAATCCTG~AGCCAA	ATCCTGTITTTCTGAAAAACAAACCAAGGIT CAGAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Solanum melongena</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGTITTTCTCAAAACAAACAAAGGTT CAGAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Raphanus sativus</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGAGTTACGCGAAACAAACCAAGAGT TTAGAAAGCGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Brassica oleracea capitata</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGGGTTACGCGAAACAAACAGAGT TTAGAAAGCGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Brassica rapa rapa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGGGTTACGCGAAACAAACCAAGAGT TTAGAAAGCGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Brassica nigra</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGGGTTACGCGAAACAAACCAAGAGT TTAGAAAGCGG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG

<u>Nombre científico</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>g</i></u>	<u>Secuencia de la región amplificada</u>	<u>Secuencia de la región que corresponde al cebador <i>h</i></u>
<i>Olea europaea</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCCTGTTTTCCCAAAACAAAGGTTTCAGAAAGAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG
<i>Urtica dioica</i>	GGGCAATCCTG.AACCAA	ATCTGGTGTATTATAAAACAAAGCGATAAAA AAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAA CGG
<i>Rumex acetosa</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	CTCCTCCTTTCCAAAGGAAGAATAAAAA AG	GATAGGTGCAGAGACTCAA TGG

ES 2 343 261 T3

La región amplificada muestra no sólo una variación de tamaño entre las diferentes especies, sino también una variación de secuencias. Es interesante observar que el nivel de variabilidad permite identificar la gran mayoría de las especies consumidas. Sin embargo, las especies parecidas pueden en ciertos casos no ser discernibles. Es el caso en el presente ejemplo entre el trigo y el centeno, y entre la col y el nabo.

La tabla 3 representa los nombres comunes y orígenes de las secuencias de los alimentos de la tabla 2. LECA = secuencias realizadas por los inventores.

TABLA 3

<u>Nombre científico</u>	<u>Nombre del alimento</u>	<u>Origen</u>
<i>Theobroa cacao</i>	Cacao	LECA
<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha azucarera	LECA
<i>Castanea sativa</i>	Castaña	GenBank: AF133653
<i>Cannabis sativa</i>	Cannabis	GenBank: AF501598
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	GenBank: AB 117648
<i>Saccharum officinarum</i>	Caña de azúcar	GenBank: AY116253
<i>Asparagus officinalis</i>	Espárrago	GenBank: AJ441164
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	GenBank: AB042240
<i>Secale cereale</i>	Centeno	GenBank: AF519162
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	GenBank: X15901
<i>Panicum miliaceum</i>	Mijo	GenBank: AY142738
<i>Ribes aureum</i>	Grosellero de flor amarilla	GenBank: AF374816
<i>Fragaria vesca</i>	Fresa	LECA
<i>Citrus x paradisi</i>	Limón/naranja	GenBank: AY295277
<i>Triphasia trifolia</i>	Naranjo espinoso	GenBank: AY295297
<i>Vitis vinifera</i>	Uva	LECA
<i>Prunus persica</i>	Melocotón	GenBank: AF348560
<i>Prunus armeriana</i>	Albaricoque	LECA
<i>Prunus cerasus</i>	Cereza	LECA
<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwi	GenBank: AF534655
<i>Zea mais</i>	Maíz	GenBank: NC 001666
<i>Pisum sativum</i>	Guisante	LECA
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Judía	GenBank: AY077945
<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo	GenBank: AY116244
<i>Cynara cardunculus</i>	Alcachofa	GenBank: AF129828
<i>Arctium lappa</i>	Bardana mayor	GenBank: AF129824
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga	GenBank: U82042
<i>Helianthus annuus</i>	Girasol	GenBank: U82038
<i>Ficus carica</i>	Higo	LECA
<i>Humulus lupulus</i>	Lúpulo	GenBank: AF501599
<i>Avena sativa</i>	Avena	GenBank: X75695
<i>Nasturtium officinale</i>	Berro	GenBank: AY122457
<i>Armoracia rusticana</i>	Rábano picante	GenBank: AF079350
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	GenBank: X74574

TABLA 3 (continuación)

Nombre científico	Nombre del alimento	Origen
<i>Anthriscus cerefolium</i>	Perifollo	GenBank: AF432022
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	LECA
<i>Allium porum</i> -	Puerro	LECA
<i>Carum petroselinum</i>	Perejil	LECA
<i>Solanum tuberosum</i>	Patata	LECA
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	GenBank: AY098703
<i>Solanum melongena</i>	Berenjena	GenBank: AY266240
<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	GenBank: AF451576
<i>Brassica oleracea capitata</i>	Col	GenBank: AF451574
<i>Brassica rapa rapa</i>	Nabo	GenBank: AF451573
<i>Brassica nigra</i>	Mostaza negra	GenBank: AF451579
<i>Olea europaea</i>	Oliva	LECA
<i>Urtica dioica</i>	Ortiga	GenBank: AY208725
<i>Rumex acetosa</i>	Acedera	GenBank: AY177334

4) Ejemplos de aplicaciones a unos sustratos degradados

Se han realizado varios experimentos que demuestran claramente la validez del enfoque propuesto en la presente solicitud.

El ADN de varios sustratos complejos y/o transformados ha sido extraído utilizando un kit de extracción habitual y siguiendo las instrucciones del fabricante (Dneasy Plant Mini kit, Qiagen). Los sustratos ensayados son los siguientes:

- (i) Caña de azúcar
- (ii) Patata cocida
- (iii) Pasta cocida
- (iv) Sopa en polvo liofilizada.

Para los alimentos sólidos, el ADN ha sido extraído a partir de 50 mg de peso seco. El volumen final del extracto de ADN ha sido recuperado en 200 μ l.

La amplificación se ha realizado utilizando los cebadores g y h (tabla 1), y las condiciones de amplificación siguientes:

- (i) Volumen final: 25 μ l
- (ii) $MgCl_2$: 2 mM
- (iii) dNTP: 0,2 mM cada uno
- (iv) Cebadores: 1 μ M cada uno
- (v) Taq polimerasa (Amplitaq Gold, Perkin Elmer): 1 unidad
- (vi) BSA: 0,2 μ l por tubo
- (vii) Volumen de extracto de ADN utilizado: 2,5 μ l (1/80 del extracto)
- (viii) Desnaturalización inicial de 10 mn a 95°C
- (ix) Número de ciclos: 35 (salvo para la caña de azúcar: 50)
- (x) Desnaturalización: 30 s a 95°C, hibridación: 30 s a 55°C, Elongación: 60 s a 72°C.

ES 2 343 261 T3

La figura 2 ilustra un resultado de amplificación. Los productos de amplificación han sido secuenciados a continuación mediante secuenciación directa en un secuenciador automático capilar ABI 3100. Las secuencias obtenidas para la caña de azúcar, la patata cocida y la pasta cocida son idénticas respectivamente a las secuencias de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), de la patata (*Solanum tuberosum*), y del trigo (*Triticum aestivum*). Por el contrario, la secuencia obtenida mediante secuenciación directa para la sopa en polvo liofilizada no es legible, lo que indica que se trata de una mezcla. Por lo tanto, los inventores han clonado el producto PCR de la sopa en polvo liofilizada con el fin de separar las diferentes moléculas. De 23 clones secuenciados, se han obtenido 19 clones que contienen la secuencia del puerro, tres clones que contienen la secuencia de la patata, y uno solo que contiene la secuencia de la cebolla.

La tabla 4 muestra los resultados de la clonación del producto de amplificación obtenido a partir de la sopa en polvo liofilizada (23 clones secuenciados). Los resultados obtenidos corresponden a la composición indicada en el sobre.

TABLA 4

Secuencia obtenida	Identificación	Número
ATCTTTATTTTTTGAAAAACAAGGGTTTAAAA AAGAGAATAAAAAAG	Puerro	9
ATCCTGTTTTCTGAAAACAAACAAAGGTTCA GAAAAAAG	Patata	3
ATCTTTCTTTTTTGAAAAACAAGGGTTTAAAA AAGAGAATAAAAAAG	Cebolla	1

5) Ejemplo comparativo sobre sustrato degradado con los cebadores g, h y c, d

El objetivo de este experimento era comparar la presente invención con el estudio publicado en 1991, (Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, 17, 1105-1109).

El ADN genómico ha sido extraído a partir de 100 mg de miga de pan utilizando un kit de extracción (Dneasy Plant Mini kit, Qiagen) y siguiendo las instrucciones del suministrador. El volumen final del extracto de ADN ha sido recuperado en 100 μ l.

La amplificación se ha realizado utilizando por un lado los cebadores g y h, y por otro lado los cebadores c y d (Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, 17, 1105-1109). Se han aplicado las condiciones de amplificación siguientes:

Volumen final: 25 μ l

MgCl₂: 2 mM

dNTP: 0,2 mM cada uno

Cebadores: 1 μ M cada uno

Taq polimerasa (Amplitaq Gold, Perkin Elmer): 1 unidad

BSA: 0,2 μ l por tubo

Volumen de extracto de ADN utilizado: 2,5 μ l (1/80 del extracto)

Desnaturalización inicial de 10 mn a 95°C

Número de ciclos: 25

Desnaturalización: 30 s a 95°C, hibridación: 30 s a 55°C, elongación: 60 s a 72°C.

La figura 3 presenta los resultados obtenidos. No aparece ningún producto de amplificación con los cebadores c y d, mientras que se obtiene un producto de amplificación con los cebadores g y h.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Par de oligonucleótidos, **caracterizado** porque el primer oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 68 y el segundo oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 69, en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación selectiva de una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* del tabaco cuya secuencia está representada en la SEC ID nº 3.
- 10 2. Par de oligonucleótidos, **caracterizado** porque el primer oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 68 y el segundo oligonucleótido se hibrida a la secuencia de la SEC ID nº 69, en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación selectiva de una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales cuya secuencia está representada en las SEC ID nº 24 a nº 67.
- 15 3. Par de oligonucleótidos según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la hibridación se efectúa a 55°C en un tampón de amplificación que comprende MgCl₂ 2 mM.
- 20 4. Par de oligonucleótidos según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el primer oligonucleótido se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 1, nº 4 a nº 15, y el segundo oligonucleótido se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 2, nº 16 a nº 23.
- 25 5. Oligonucleótido, **caracterizado** porque su secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por la SEC ID nº 1, la SEC ID nº 2, las SEC ID nº 4 a nº 15 y las SEC ID nº 16 a nº 23.
6. Polinucleótido, **caracterizado** porque su secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.
7. Par de oligonucleótidos según una de las reivindicaciones 1 a 4, oligonucleótido según la reivindicación 5 o polinucleótido según la reivindicación 6, **caracterizados** porque se inmovilizan sobre un soporte sólido.
- 30 8. Procedimiento de amplificación de una región variable del ADN cloroplástico de los vegetales, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
 - c) disponer de una muestra que comprende ADN genómico vegetal;
 - 35 d) amplificar una región variable del ADN cloroplástico con un par de oligonucleótidos según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, o con por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 5.
- 40 9. Procedimiento de amplificación de una región variable del ADN cloroplástico de los vegetales según la reivindicación 8, **caracterizado** porque en la etapa b) la región variable del ADN cloroplástico amplificada es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.
- 45 10. Procedimiento de detección de una especie vegetal en una muestra, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
 - d) disponer de una muestra susceptible de contener una especie vegetal;
 - e) efectuar una reacción de amplificación con un par de oligonucleótidos según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, o con por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 5;
 - 50 f) detectar la obtención de un producto de amplificación que atestigua la presencia de una especie vegetal en la muestra.
- 55 11. Procedimiento de detección de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 10, **caracterizado** porque en la etapa c) el producto de amplificación es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 24 a nº 67.
- 60 12. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
 - a) disponer de una muestra susceptible de contener una especie vegetal;
 - b) efectuar una reacción de amplificación con un par de oligonucleótidos según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, o con por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 5;
 - 65 c) analizar el producto obtenido para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

ES 2 343 261 T3

13. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 12, en el que en la etapa c) el producto de amplificación es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID n° 24 a n° 67.

14. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 12 ó 13, en el que en la etapa c) se determina la secuencia del producto de amplificación para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

15. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 12 ó 13, en el que en la etapa c) se hibrida el producto de amplificación con por lo menos una secuencia vegetal de referencia para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

16. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 15, en el que la secuencia de referencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID n° 3 y n° 24 a n° 67.

17. Procedimiento de identificación de una especie vegetal en una muestra según la reivindicación 12 ó 13, en el que en la etapa c) se analiza el producto de amplificación mediante electroforesis para identificar la especie vegetal contenida en la muestra.

18. Utilización de la región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales que corresponde a las posiciones 49425 a 49466 del ADN cloroplástico del tabaco para la detección y la identificación de especies vegetales.

19. Utilización según la reivindicación 18, en la que la región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* de los vegetales es un polinucleótido cuya secuencia se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID n° 24 a n° 67.

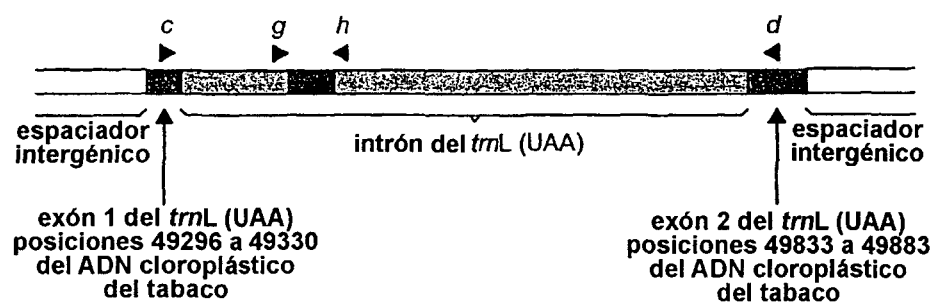


Fig. 1

ES 2 343 261 T3

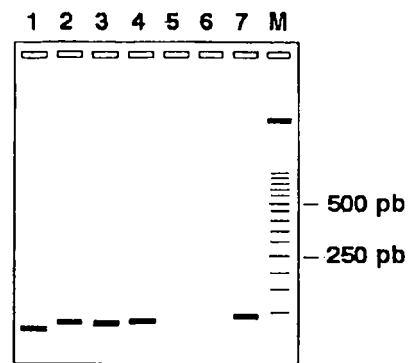


Fig. 2

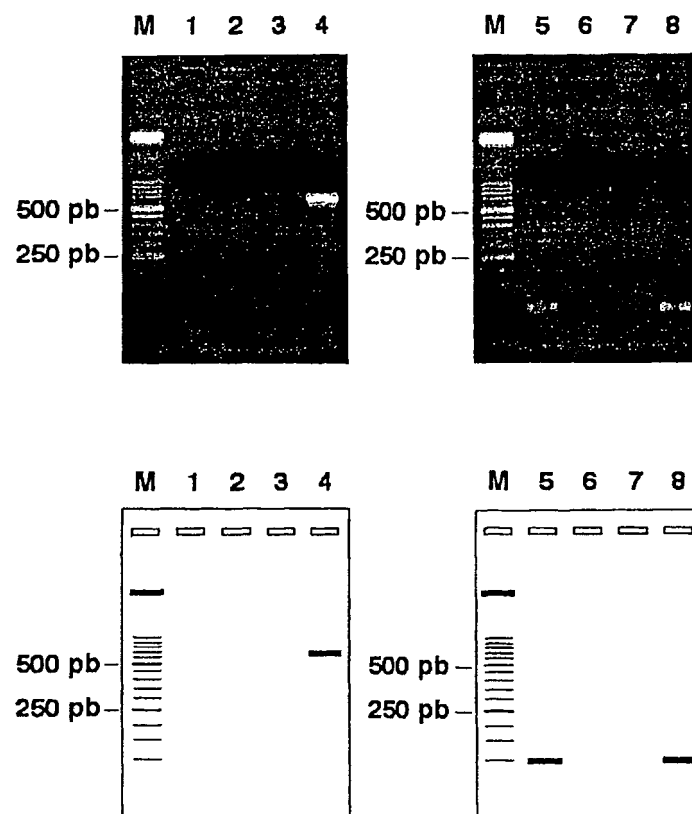


Fig. 3

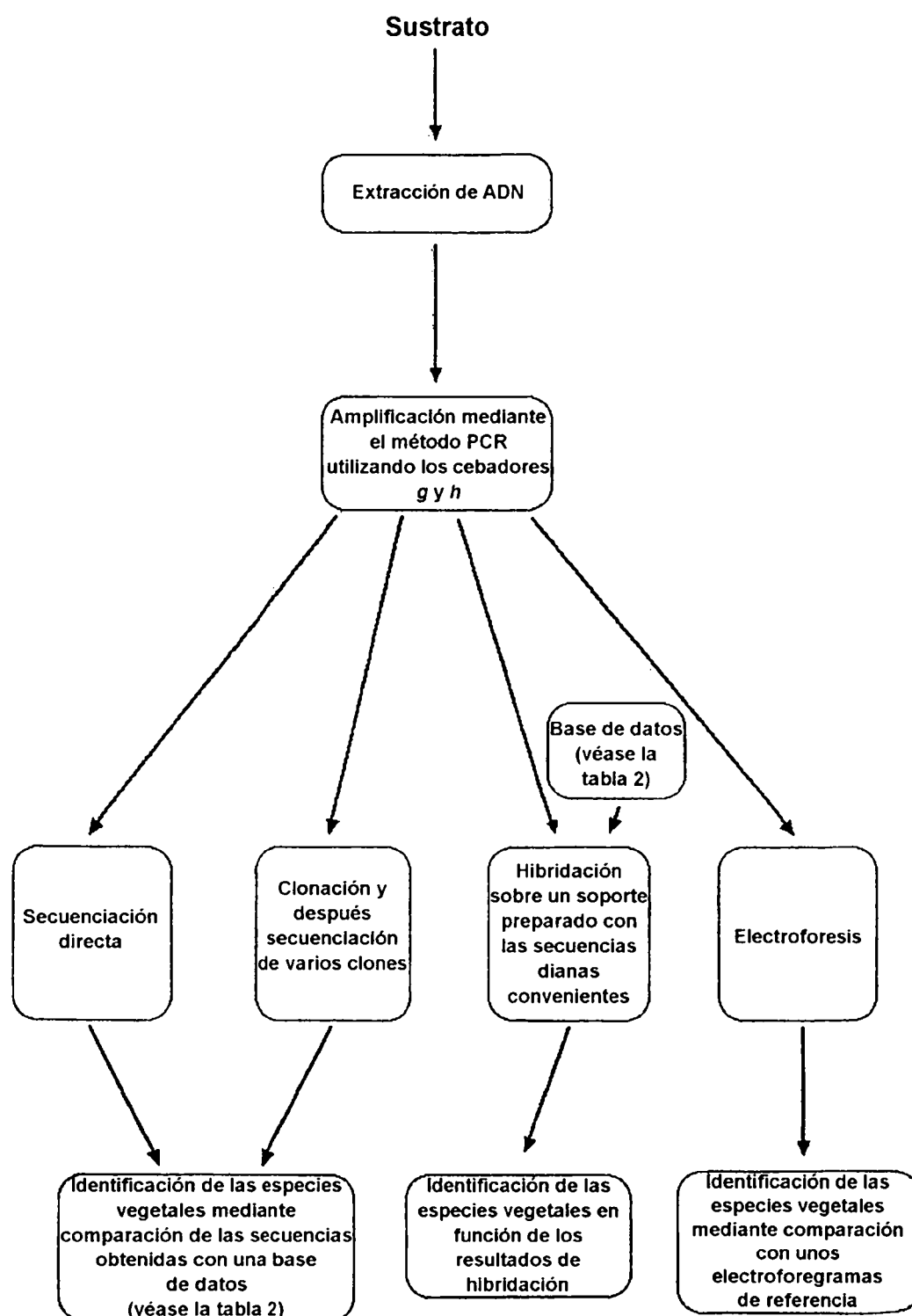


Fig. 4

ES 2 343 261 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Université Joseph Fourier CNRS	
5	<120> Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de vegetales en unas mezclas complejas	
	<130> KH/SG/BRO51584	
10	<160> 69	
	<170> PatentIn versión 3.2	
	<210> 1	
15	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nicotiana tabacum</i>	
20	<400> 1	
	gggcaatcct gagccaa	17
25	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Nicotiana tabacum</i>	
	<400> 2	
35	ccattgagtc tctgcaccta tc	22
	<210> 3	
40	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nicotiana tabacum</i>	
45	<400> 3	
	atcctgtttt ccgaaaacaa acaaagggtc agaaaaaaag	40
50	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Prunus pérsica</i>	
	<400> 4	
60	gggcgatcct gagccaa	17
	<210> 5	
65	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Urtica dioica</i>	

ES 2 343 261 T3

	<400> 5	
5	gggcaatcct gaaccaa	17
	<210> 6	
	<211> 17	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 6	
15	aggcaatcct gagccaa	17
	<210> 7	
20	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<400> 7	
	cggcaatcct gagccaa	17
30	<210> 8	
	<211> 17	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 8	
40	gggtaatcct gagccaa	17
	<210> 9	
45	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<400> 9	
	gggcatcct gagccaa	17
55	<210> 10	
	<211> 17	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 10	
65	gggctatcct gagccaa	17

ES 2 343 261 T3

	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<400> 11	
10	gggccatcct gagccaa	17
	<210> 12	
	<211> 17	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 12	
20	gggcaattct gagccaa	17
	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<400> 13	
35	gggcaatcct gggccaa	17
	<210> 14	
	<211> 17	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 14	
45	gggcaatcct gacccaa	17
	<210> 15	
	<211> 17	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<400> 15	
60	gggcaatcct gatccaa	17
	<210> 16	
	<211> 22	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Beta vulgaris</i>	

ES 2 343 261 T3

	<400> 16	
5	cctttgagtc tctgcaccta tc	22
	<210> 17	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<400> 17	
15	ccatagagtc tctgcaccta tc	22
	<210> 18	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Cynara cardunculus</i>	
25	<400> 18	
	ccatcgagtc tctgcaccta tc	22
30	<210> 19	
	<211> 22	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Urtica dioica</i>	
	<400> 19	
40	ccgttgagtc tctgcaccta tc	22
	<210> 20	
45	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<400> 20	
	ccattgagtc tctgtaccta tc	22
55	<210> 21	
	<211> 22	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 21	
65	ccattgagtc tcggcaccta tc	22

ES 2 343 261 T3

	<210> 22		
	<211> 22		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<400> 22		
10	ccgtcgagtc tctgcaccta tc	22	
	<210> 23		
15	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<400> 23		
	ccattgagtc tctgcacctg tc	22	
25	<210> 24		
	<211> 65		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Theobroma cacao</i>		
	<400> 24		
35	atcctattat tttattattt tacgaaacta aacaaagggtt cagcaagcga gaataataaa	60	
	aaaag	65	
40	<210> 25		
	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> <i>Beta vulgaris</i>		
45	<400> 25		
50	ctcctttttt caaaagaaaa aaaataagga ttccgaaaac aagaataaaa aaaaag	56	
	<210> 26		
	<211> 55		
55	<212> ADN		
	<213> <i>Castanea sativa</i>		
	<400> 26		
60	atcctatttt acgaaaacaa ataagggttc agaagaaagc gagaataaaa aaaag	55	
65	<210> 27		
	<211> 55		
	<212> ADN		

ES 2 343 261 T3

<213> *Cannabis sativa*

<400> 27

5 atccgggttt ctgaaaacaa acaaggattc agaaagcaat aataaaaaag aatag 55

<210> 28

<211> 54

<212> ADN

<213> *cicer arietinum*

<400> 28

10 atcctgcttt cggaaaacaa acaaaaaaag ttcagaaagt taaatcaaa aaag 54

<210> 29

<211> 53

25 <212> ADN

<213> *Saccharum officinarum*

<400> 29

30 atcccccttt ttgaaaaaac aagtgttct caaactagaa cccaaggaa aag 53

<210> 30

<211> 53

<212> ADN

<213> *Asparagus officinalis*

<400> 30

40 atctttatgt ttagaaaaac aagggtttta atttaaaac tagaagaaaa agg 53

<210> 31

<211> 52

50 <212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

<400> 31

55 atccgtgttt tgagaaaaca aggggttctc gaactagaat acaaaggaaa ag 52

<210> 32

<211> 52

<212> ADN

<213> *oryza sativa*

ES 2 343 261 T3

<400> 32

5 atccatgttt tgagaaaaca agcgggtctc gaactagaac ccaaaggaaa ag 52

<210> 33

<211> 52

10 <212> ADN

<213> *Panicum miliaceum*

<400> 33

15 atcccttttt tgaaaaaaca agtgggtctc aaactagaac ccaaaggaaa ag 52

<210> 34

<211> 52

<212> ADN

25 <213> *Ribes aureum*

<400> 34

30 atcctgtttt acaaacaaaa cacaagagtt cacaagaga gaataaaaaa ag 52

<210> 35

<211> 52

35 <212> ADN

<213> *Fragaria yesca*

<400> 35

40 atcccgtttt atgaaaacaa acaagggttt cagaaagcga gaataataa ag 52

<210> 36

<211> 52

<212> ADN

50 <213> *citrus X paradisi*

<400> 36

55 atcctcttct cttttccaag aacaaacagg gggtcagaaa gcgaaaaagg gg 52

<210> 37

<211> 52

60 <212> ADN

<213> *Triphasia trifolia*

<400> 37

65 atcctcttct cttttccaag aacaaacagg gggtcagaaa gcgaaaaagg gg 52

ES 2 343 261 T3

	<210> 38	
	<211> 51	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Vitis vinifera</i>	
	<400> 38	
10	atcctgtttt ccgaaaacaa ccaagggttc agaaaacgat aataaaaaa g	51
	<210> 39	
15	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Prunus pérsica</i>	
20	<400> 39	
25	atcctgtttt attaaaacaa acaagggttt cataaaccga gaataaaaaa g	51
	<210> 40	
	<211> 51	
30	<212> ADN	
	<213> <i>Actinidia chinensis</i>	
	<400> 40	
35	atccttttff tcgaaaacaa acaaagattc agaaagcgaa aataaaacaa g	51
40	<210> 41	
	<211> 51	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Zea mays</i>	
	<400> 41	
50	atcccttttt tgaaaaacaa gtggttctca aactagaacc caaaggaaaa g	51
	<210> 42	
55	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Pisum sativum</i>	
60	<400> 42	
	atccttcttt ctgaaaacaa ataaaagttc agaaagtga aatcaaaaaa g	51
65	<210> 43	
	<211> 50	
	<212> ADN	

ES 2 343 261 T3

<213> *Phaseolus vulgaris*

<400> 43

5 atccccgttt ctgaaaaaaaa gaaaaattca gaaagtata ataaaaaagg 50

<210> 44

10 <211> 50

<212> ADN

<213> *Sorghum halepense*

15 <400> 44

20 atccactttt ttcaaaaaag tgggtctcaa actagaaccc aaaggaaaag 50

<210> 45

<211> 50

25 <212> ADN

<213> *cynara cardunculus*

<400> 45

30 atcacgtttt ccgaaactaa acaaagggtc agaaagcgaa aatcaaaaag 50

35 <210> 46

<211> 50

<212> ADN

<213> *Arctium lappa*

40 <400> 46

45 atcacgtttt ccgaaaacaa acaaagggtc agaaagcgaa aataaaaaag 50

<210> 47

<211> 50

50 <212> ADN

<213> *Lactuca sativa*

<400> 47

55 atcacgtttt ccgaaaacaa acaacgggtc agaaagcgaa aatcaaaaag 50

60 <210> 48

<211> 50

<212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

65

ES 2 343 261 T3

	<400> 48	
5	atcacgtttt ccgaaaacaa acaaagggttc agaaagcgaa aataaaaaag	50
	<210> 49	
	<211> 50	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Ficus carica</i>	
	<400> 49	
15	atccggtttt ctgaaaacaa acaagggttc agaaggcgat aataaaaaag	50
	<210> 50	
20	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Humulus lupulus</i>	
25	<400> 50	
30	atccggtttt ctgaaaacaa acaagggttc agaaagcaat aataaaggg	49
	<210> 51	
	<211> 48	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Avena sativa</i>	
	<400> 51	
40	atccgtgttt tgagaggggg gttctcgaac tagaatacaa aggaaaag	48
45	<210> 52	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nasturtium officinaie</i>	
50	<400> 52	
55	atccttggtt acgcaaacaa accggagttt agaaagcgag aaaaaagg	48
	<210> 53	
	<211> 48	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Armoracia rusticana</i>	
	<400> 53	
65	atccttggtt acgcgaacaa acctgagttt agaaagcgag ataaaagg	48

ES 2 343 261 T3

	<210> 54	
	<211> 47	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Hordeum vulgare</i>	
	<400> 54	
10	atccgtgttt tgagaaggga ttctcgaact agaatacaaa ggaaaag	47
	<210> 55	
15	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> <i>Anthriscus cerefolium</i>	
20	<400> 55	
	atcctatttt ttcaaaaac aaacaaaggc ccagaagggtg aaaaaag	47
25	<210> 56	
	<211> 47	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Allium cepa</i>	
	<400> 56	
35	atctttcttt ttgaaaaac aagggttttaaaaagagaat aaaaaag	47
	<210> 57	
40	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> <i>Allium porrum</i>	
45	<400> 57	
	atctttattt ttgaaaaac aagggttttaaaaagagaat aaaaaag	47
50	<210> 58	
	<211> 45	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Carum petroselinum</i>	
	<400> 58	
60	atcctatttt ccaaaaacaa acaaaggccc agaagggtgaa aaaag	45
	<210> 59	
65	<211> 40	
	<212> ADN	

ES 2 343 261 T3

	<213> <i>Solarium tuberosum</i>	
	<400> 59	
5	atcctgtttt ctgaaaacaa acaaagggtc agaaaaaaag	40
10	<210> 60	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> <i>Solarium lycopersicum</i>	
15	<400> 60	
20	atcctgtttt ctgaaaacaa accaagggtc agaaaaaaag	40
	<210> 61	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Solarium melongena</i>	
	<400> 61	
30	atcctgtttt ctcaaaacaa acaaagggtc agaaaaaaag	40
35	<210> 62	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> <i>Raphanus sativus</i>	
40	<400> 62	
45	atcctgagtt acgccaacaa accagagttt agaaagcgg	39
	<210> 63	
	<211> 39	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Brassica oleracea capitata</i>	
	<400> 63	
55	atcctggggtt acgccaacaa aacagagttt agaaagcgg	39
60	<210> 64	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> <i>Brassica nigra</i>	
65		

ES 2 343 261 T3

<400> 64

atcctgggtt acgcaacaa accagagttt agaaagcgg

39

5

<210> 65

<211> 39

10 <212> ADN

<213> *otea europaea*

<400> 65

15

atcctgtttt cccaaaacaa aggttcagaa agaaaaaag

39

20 <210> 66

<211> 34

<212> ADN

<213> *Urtica dioica*

25

<400> 66

atctgggtgtt ataaaaacaaa gcgataaaaa aaag

34

30

<210> 67

<211> 31

35 <212> ADN

<213> *Rumex acetosa*

<400> 67

40

ctcctccttt ccaaaaggaa gaataaaaaa g

31

45 <210> 68

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<400> 68

ttggctcagg attgccc

17

55

<210> 69

<211> 22

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 69

65

gataggtgca gagactcaat gg

22