



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-088188- -00009-0000

Fecha: 2008-06-13 16:19:20 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 17

Señor
JEFE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

REF: EXPEDIENTE: 04-0088188
TITULO: "JUEGO DE PRIMERS Y PROCEDIMIENTO PARA
DETECTAR UN MARCADOR DE SEXO
MASCULINO..."
ACTUACIÓN: RESPUESTA A EXAMEN DE PATENTABILIDAD

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 17.117.818 expedida en Bogotá, Abogado titulado en ejercicio y portador de la Tarjeta Profesional No. 17.402 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando en calidad de apoderado de la UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, según poder debidamente conferido y legalizado, adjunto a las diligencias administrativas de la referencia.

Encontrándome dentro del término legal comparezco para responder el oficio de Requerimiento No. 3896 del Examen emanado de esa Oficina, y con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de 2.000 de C.A.N, damos respuesta en los siguientes términos.

1. Claridad de la solicitud:

Para atender el requerimiento y sugerencias del señor examinador respecto a la claridad de la solicitud y según el Art. 30 de la Decisión 486 se presenta:



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark Marcas
Patent Patentes
Health Permit Registros Sanitarios
Software Soporte Lógico
Commercial Name Nombres Comerciales
Design Diseños

1.2.- Nuevo pliego de reivindicatorio que se compone de una reivindicación, el que se ajusta correctamente a la solicitud de modelo de utilidad, para reclamar protección de los primers diseñados por el solicitante para detección de un marcador de sexo en plantas de borojó. y cumple con los requisitos de Novedad.

1.3.- Se presenta un nuevo capítulo descriptivo, en el que se hacen algunas aclaraciones, sin ampliar ni exceder la memoria original:

1.4- Presentamos un nuevo Título

TM

"JUEGO DE PRIMERS PARA DETECTAR UN MARCADOR DE SEXO MASCULINO EN PLANTAS DE BOROJO"

1.2 Se ha solicitado la modificación de la invención, de Patente de invención a Modelo de utilidad, con el fin de dar cumplimiento a lo exigido por el Artículo 16 de la Decisión 486 de la CAN., por lo tanto se anexa:

- Copia formato de modificaciones debidamente radicado ante su Despacho con el que se han cancelado las tasas exigidas para este trámite.

Las anteriores con un contenido que se ajusta a los límites impuestos por la memoria descriptiva original.

Por lo anteriormente expuesto, ruego a usted dar por subsanado dicho requerimiento, sin perjuicio de lo cual desde ya nos acogemos a lo dispuesto por el inciso segundo del artículo 45 de la decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones que a la letra dice: "(...)"

Cuando la oficina nacional competente estimare que ello es necesario para los fines del examen de patentabilidad, podrá notifica al solicitante dos o más veces (...)"

NOTIFICACIONES

Mi poderdante y yo recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi Oficina de Abogado ubicada en la Carrera 13A No. 28-38 Ofc. 246 MZ. 2 Parque Central Bavaria de la ciudad de Bogotá D.C.

Del señor Jefe



CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

No. 17.117.818 expedida en Bogotá

T.P No. 17.402 del C.S.J.

PATENTE MODELO DE UTILIDAD

JUEGO DE PRIMERS PARA DETECTAR UN MARCADOR DE SEXO MASCULINO EN PLANTAS DE BOROJO

ESFERA TECNOLÓGICA

Proveer un juego de Primers o iniciadores de 20 y 22 pares de bases para diagnosticar el sexo en plantas de borojo conforme a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Este modelo se ubica en el área de la Biotecnología.

ESTADO DE LA TECNICA

Existe el documento US4683195 con fecha de publicación 28 de julio de 1987 que divulga el proceso de PCR que corresponde a las características de una PCR convencional.

Existe el documento US6180345 con fecha de publicación 30 de enero de 2001, que enseña la aplicación de técnicas de biología molecular para determinar el sexo en Papaya.

La presente patente de modelo de utilidad pretende determinar el sexo a edad temprana en Borojo por medio de un juego de Primers.

Las plantas femeninas de muchas especies dioicas son de valor comercial por la producción de frutos, tales como papaya y kiwi o de semillas como pistacho, nuez moscada, pimienta negra, por lo que se prefieren en altas proporciones en un cultivo (Parasnis et al 2000, Ainsworth, 2000). Sin embargo en muchas especies dioicas el sexo no es revelado sino hasta alcanzar la madurez cuando aparecen las flores, lo cual puede tomar

de meses a años. Unas pocas especies dioicas contienen cromosomas heteromórficos como *Silene*, *Rumex* y *Humulus*, lo que permite identificar su sexo citológicamente (Negruțiu et al, 2001). Sin embargo, muchas de las especies dioicas carecen de cromosomas sexuales diferentes morfológicamente, lo que ha generado un interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo de plantas dioicas a través de marcadores moleculares. Las técnicas basadas en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) han sido de gran utilidad y han sido explotadas para detectar diferencias entre plantas masculinas y femeninas a nivel molecular. Existen en vegetales varios marcadores moleculares ligados al sexo generados ya sea a través de estudios de mapeo genético (Spada et al, 1998, Liu et al, 2004) o de investigaciones encaminadas a encontrar marcadores ligados al sexo de especies agrónomicamente importantes, por ejemplo se han usado microsatélites para identificar diferencias específicas de sexo en papaya, *Carica papaya* (Parasnis et al, 1999), AFLP para la identificación de marcadores ligados al sexo de *Dioscorea tokoro* (Terauchi y Kahl, 1999) de espárrago *Asparagus officinalis* (Reamon-Büttner et al, 1999) y patrones de bandas RAPD ligados al sexo de marihuana *Cannabis sativa* L. (Mandolino et al, 2002), de álamo *Salix viminalis* L. (Alstrom-Rapaport et al, 1998) de *Atriplex garrettii* (Ruas et al, 1998) y de *Silene latifolia* (Nakao et al, 2002). En especies como papaya y kiwi el diagnóstico del sexo puede realizarse desde estados tempranos de desarrollo de la planta gracias al diseño iniciadores de PCR a partir de marcadores moleculares (Parasnis et al, 2000, Deputy et al, 2002, Gill et al, 1998).

REVELACIÓN DE LA INVENCION

El presente modelo de utilidad se relaciona con un método de protocolo para identificar el sexo de especies vegetales, particularmente el borojo, planta nativa del Chocó en

Colombia a través de marcadores moleculares asociados al sexo de dicha especie vegetal.

Un objetivo del modelo propuesto es proveer marcadores moleculares específicos a partir de una secuencia de nucleótidos que permita el diseño de una iniciadores para determinar el sexo de planta o especies vegetales en edad temprana mediante la reacción en cadena de la polimerasa que aquí llamaremos PCR.

Otro objetivo es igualmente proveer una secuencia de 210 bases del marcador AFLPE/M-CAA

El principal objetivo es proveer un juego de Primers o secuencia de los iniciadores de 20 y 22 pares de bases para diagnosticar el sexo en plantas de borojo conforme a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Esta invención se ubica en el área de la Biotecnología.

El borojó es una especie originaria del departamento del Chocó (Colombia) que pertenece a la tribu Gardenieae, género Magnoliopsida, orden Rubiales, familia Rubiaceae, especie Borojoa patinoi Cuatrecasas (Cuatrecasas, 1948). Hace parte de los ecosistemas de vega de río a lo largo del Pacífico colombiano, es endémico de esta región, ampliamente cultivado encontrándose desde Bahía Solano (Chocó) hasta el río Naya (límites de Valle y Cauca), aunque actualmente está diseminada en todo el territorio colombiano incluyendo la Amazonía y la zona cafetera, ya que se adapta desde los 0 a los 500 m.s.n.m, pero en condiciones óptimas, requiere precipitaciones mayores a 400 mm y una temperatura media de 26 °C. Los sitios de producción comercial de la fruta son el Chocó (zona del Atrato, Loró y Bajo San Juan) y el Valle del Cauca (región del Bajo

Anchicayá y el Bajo Calima (Buenaventura) (Constantino et al, 2000).

El borojó hace parte del pequeño grupo de plantas que florecen y que son sexualmente dimórficas, las plantas dioicas. Los árboles machos no productores de frutos, no se diferencian fenotípicamente de las hembras antes de la floración, las inflorescencias masculinas son terminales, en racimo, color blanco crema y las flores femeninas son solitarias, terminales y también color blanco crema. El fruto es una baya que en sus primeros estadios es verde claro y al madurar se torna pardo rojizo, tiene un mesocarpo carnoso con sabor aromático y muy perfumado, tiene propiedades alimenticias por poseer aminoácidos esenciales y es fuente de calcio, hierro, fósforo y vitamina C. Posee metabolitos secundarios de gran interés como modelos químicos para nuevas drogas. Además posee propiedades que le atribuye la medicina tradicional y popular como diurético, cicatrizante, afrodisíaco y antitumoral (Gentry, 1982, 1988). Teniendo en cuenta estas propiedades, la expectativa de mercadeo alrededor de la fruta de borojó en el ámbito nacional e internacional es prometedora, la proyección comercial muestra una rentabilidad superior o igual a la de ciertos cultivos comerciales de la zona andina e interandina. La producción bajo condiciones naturales con técnicas del saber tradicional es de 5 a 12 frutos árbol/año durante los primeros 5 años y de 12 a 30 frutos árbol/año para el resto del período de utilidad (Mosquera y Arenas, 1995)

Problema técnico que se solucionó

Uno de las dificultades que presenta el cultivo del borojó es poder reconocer el sexo de las plantas antes de la floración, aspecto que sería muy ventajoso a la hora de establecer un cultivo. Pero no existe un método basado

en características como formas, tamaños, apariencia de la planta, hoja o fruto para distinguir las plantas femeninas de las masculinas antes de que estas florezcan. Cuando se establece un cultivo sin conocer el sexo de las plantas, es probable que cuando florezcan aproximadamente la mitad resulten machos y esto representa un costo en espacio, tiempo y dinero debido, a que estos árboles machos no van a producir frutos. Si se puede determinar el sexo de plantas de borojó en edad temprana, se puede diseñar el cultivo y determinar cuántas plantas masculinas serán suficientes para polinizar las plantas femeninas, esto permitiría establecer cultivos comerciales más productivos. Se evitará de esta manera sembrar plantas macho improductivas con la consiguiente pérdida de tiempo, espacio de sembrado y recursos, aunque algunas sean necesarias para los procesos de fertilización.

Nosotros obtuvimos dos marcadores moleculares específicos para plantas masculinas de Borojoa patinoi C. obtenidos mediante AFLP, determinamos la secuencia de nucleótidos de uno de ellos y estamos trabajando para obtener la secuencia del segundo marcador. A partir de la secuencia de nucleótidos ya obtenida diseñamos iniciadores para determinar el sexo de las plantas en edad temprana mediante PCR.

Breve descripción de las figuras

La descripción para el procedimiento de la presente invención se acompaña de las siguientes foto-figuras a saber:

- La figura o foto 1 corresponde al marcador AFLP E-ACC/M-CAA asociado al sexo de plantas de borojo, en donde la flecha indica la banda específica para planta masculina;

- La figura o foto 2 corresponde al marcador asociado al sexo en plantas de borojo , en donde la fecha indica la banda especifica para plantas masculinas , siendo marcador AFLP E-ACC/M-CAT;
- La figura o foto 3 presenta el diagnostico de sexo en plántulas de borojo mediante PCR. en donde la presencia de banda superior corresponde a plantas macho no productoras de frutos y la banda inferior corresponde a dimeros de iniciadores;
- La figura o foto 4 presenta el diagnostico de sexo de plantas de borojo adultas mediante PCR en donde la presencia de banda corresponde a plantas macho.

MEJOR MANERA DE REALIZAR LA INVENCION

La invención se basa en procedimientos conforme al siguiente protocolo de etapas:

1 Extracción de ADN:

Para realizar la extracción de ADN el protocolo consiste en:

1. Macerar el material vegetal (hojas tiernas) con nitrógeno líquido.
2. Incubar 100 mg de cada muestra con 1.5 ml de buffer de extracción a 65 °C durante 60 minutos, mezclando ocasionalmente por inversión.
3. Completar volumen a 2 ml con cloroformo:alcohol isoamílico 24 : 1 y mezclar por inversión.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. Separar fase acuosa en otro tubo.
5. Repetir el paso 3 y 4.
6. Repetir el paso 3 y 4.
7. Adicionar a la fase acuosa 2/3 del volumen de isopropanol frío.
8. Después de incubar 2 horas a - 20°C, centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
9. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 76% y 10 mM de acetato de amonio, incubar 20 minutos a 4°C.

10. Centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.
11. Descartar sobrenadante, dejar secar el precipitado y resuspender en 200 µl de buffer TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM).
12. Adicionar 2.5 µl de RNasa A (10 mg/ml), e incubar durante 30 minutos a 37 °C.
13. Precipitar con 400 µl de etanol absoluto y 20 µl de acetato de sodio 3 M, dejar a -20 °C durante 30 minutos.
14. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
15. Lavar el precipitado con etanol al 70 %, dejar secar y resuspender en 200 µl de TE.

E.2 Reacciones de AFLPs:

Se usó el estuche comercial AFLP Analysis System I" de Invitrogen

- Las reacciones de digestión enzimática con EcoRI/MseI, la ligación de adaptadores y la reacción de preamplificación se realizaron con 300 ng de ADN iniciales, pero a la mitad del volumen recomendado en las especificaciones del estuche comercial.

- Las diluciones se modificaron como se describe en el siguiente protocolo:

1. Se digirieren 300 ng de ADN con 1,25 U de EcoRI y de MseI, en tampón 5X en un volumen total de 12.5 µl a 37 °C por 2 horas.
2. Después de inactivar las endonucleasas a 70 °C por 15 minutos, se realiza la ligación de los adaptadores, usando 12 µl de la solución para ligación de adaptadores EcoRI/MseI y 0.5 U de T4 ADN ligasa a 20 °C durante 2 horas.
3. Esta mezcla se diluye 10 veces para la reacción de PCR+1, la que se hace en un volumen de 25 µl y contiene 20 µl de la mezcla de cebadores para preamplificación, 2.5 µl de tampón 10X PCR con Mg, 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 2.5 µl de ADN diluído del paso anterior.

4. El programa de temperaturas es: 20 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg y 72°C por 60 seg.

5. Para la amplificación selectiva (PCR+3), el producto del PCR+1 se diluye 25 veces, y se hace una mezcla de 2 μ l de tampón 10X PCR con Mg, 7.9 μ l de agua ultrapura, 0.5 U de Taq ADN polimerasa, 4.5 μ l de la mezcla cebador MseI/dNTPs, 0.5 μ l de cebador EcoRI y 5 μ l de ADN preamplificado y diluido, en un volumen final de 20 μ l. Los cebadores EcoRI y MseI que presentaron una banda específica para plantas de sexo masculino fueron: E AAC – M CAA y E ACC – M CAT

6. El programa de temperaturas es: a) 1 ciclo a 94°C por 30 seg; 65 °C por 30 seg y 72°C por 60 seg; b) 13 ciclos en los que la temperatura de alineamiento bajó 0.7 °C en cada ciclo; c) 23 ciclos a: 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 60 seg.

E.3. Separación electroforética de los productos de la reacción de AFLP

Se realiza una electroforesis en TBE 1X para separar los productos del PCR+3 en un gel de poliacrilamida al 6% y 7 M de urea preparado también en TBE 1X:

1. Uno de los vidrios se trata con Sigmacote (Sigma), lo que facilita separar el gel del vidrio después de la corrida electroforética.

2. Paralelamente, el otro vidrio se trata con BindSilane (Promega), reactivo que favorece la unión del gel sobre el vidrio y permite realizar la tinción de plata sobre éste.

3. Los productos de PCR+3 se diluyen a la mitad con tampón de carga (95% de formamida, 1 mg mL⁻¹ de xilen cianol, 1 mg mL⁻¹ de azul de bromofenol y 10 mM EDTA) y se denaturan durante 3 min a 96°C.

4. Se colocan en hielo inmediatamente, y se mantienen allí hasta servir en el gel.

5. El gel se pre-corre sólo con tampón de carga en algunos pozos, por 25 min antes de cargar las muestras.

6. La corrida se realiza a 87 W por 2,0 a 2,5 h o hasta 5 cm antes de caer el xilen cianol desde el gel.

7. Para visualizar las bandas de ADN en el gel se tiñe con nitrato de plata siguiendo las instrucciones del estuche comercial "Silver Sequence DNA Staining Reagents" de Promega.

E.4 Secuenciación de los marcadores

El marcador asociado a sexo de la combinación E-AAC / M-CAA se purificó a partir de tres muestras directamente del gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. El método de purificación fue el siguiente:

- Adicionar 10 µl de TE o agua sobre la banda en gel teñido con nitrato de plata.
- cortar la banda con bisturí y picarla bien
- colocar en un eppendorf
- Adicionar 20 µl de TE o agua
- Colocar 5 minutos en agua hirviendo
- Centrifugar 2 minutos a 8000 rpm
- Tomar 10 µl de sobrenadante y hacer PCR con las mismas condiciones de los pasos 5 y 6 de la reacción de AFLP.

El producto de PCR se analiza en una electroforesis de poliacrilamida al 12 % y se purifica nuevamente usando el protocolo mismo protocolo anterior. Se realiza la reacción de secuenciación a partir del producto purificado, siguiendo las instrucciones del manual del estuche comercial "Silver Sequence DNA Sequencing Reagents" de Promega, de la siguiente manera:

1. Se prepara una reacción que contiene: 10.8 µl de H₂O, 10 µl de "DNA sequencing 5X buffer", 10 µl de producto purificado de PCR, 1.2 de cebador y 2 µl de Taq polimerasa. Esta mezcla se reparte entre cuatro tubos,

adicionando 8 μ l a cada uno y que contienen 4 μ l de ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP respectivamente.

2. El programa de amplificación es el siguiente: 95 °C 2 min, 50 ciclos a 95 °C 30 seg, 60 °C 30 seg y 70°C 90 seg.

El resultado se observó en un gel de acrilamida al 6% y 7 M de úrea, a partir del cual se realizaron las lecturas de las secuencias. La secuencia consenso fue:

5'-

gcaaataaaatTTTgttgatgattgttgatcattccaaagtttgaagtaaaaatcagc
tgctagcaaatgtaatctgataagtatcatcttttgatcattgatgttcctgttctgt
gacggataaacatagaatgcttttctgttttcatttcttcatttatgatgccatcagtt
ctttgcaatttgttttggttggttactcaggactca - 3'

E.5 Diseño de iniciadores para PCR

Usando el programa Gene Runner versión 3.0 se diseñaron dos iniciadores para simplificar la técnica de identificación de sexo de plantas de borojó a un PCR.

BM1a: 5'- TGTGATGATTGTTGTCATTCC- 3'

BM1b: 5'- AAATTGCAAAGAACTGATGG - 3'

E.6 Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera: 7.53 μ l de H₂O, 1.5 μ l de buffer10X, 0.9 μ l de MgCl₂ 25 mM, 0.3 μ l de una mezcla de dNTPs 2.5 mM, 0.88 μ l de iniciador 1a, 0.79 μ l de iniciador 1b, 0.1 μ l de Taq DNA polimerasa y 3 μ l de ADN.

Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 2 %.

REIVINDICACIONES

1. Un juego de primers para detección de un marcador de sexo masculino en plantas de borojó, *Borojoa patinoi* (Cuatrecasas 1948) caracterizado porque el juego de primers detecta un marcador de sexo masculino en plantas de borojó en edad temprana y tiene las secuencias:

BM1a: 5'-TGTTGATGATTGTTGTCATTCC-3'

BM1b: 5'-AAATTGCAAAGAACTGATGG - 3'

RESUMEN

este modelo de utilidad se refiere a una juego de Primers o secuencia de iniciadores 20 y 22 pares de bases para diagnosticar el sexo vegetal mediante la técnica del PCR o reacción en cadena de la Polimerasa.

Se obtiene con un procedimiento o protocolo para identificar el sexo de especies vegetales particularmente el borojo, planta nativa de Chocó en Colombia, mediante unos marcadores moleculares asociados al sexo de dicha planta. Más en particular la invención protege una secuencia de un número de bases del marcador AFLP E-ACC/M-CAA y