

37

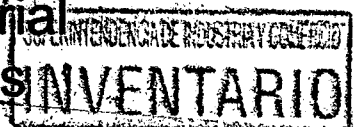
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-025439-00000-0000

Fecha: 2011-03-02 14:33:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



PCT
SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

11-25439

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: METODOS PARA LA CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE FIBRAS VEGETALES

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12Q 1/68

71. SOLICITANTE: BAYER BIOSCIENCE N.V.

DOMICILIO: Technologiepark 38, BE-9052 Gent, BELGICA

74. APODERADO: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

22. BOGOTA, D.C.,

Pedro, C
08-03-2011



No. 11-025439- -00000-0000

Fecha: 2011-03-02 14:33:56
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 132

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: 7560770 Fax: 7550158

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 2.930.616 TPA 2.698

④

INVENTOR (ES) (72)

ANTONIO ARIOLI
7307 93rd Street
Lubbock, TX 79424
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

STEVEN ENGELEN
Knaptandstraat 14 - Bus W2
B-9160 Lokeren
BELGICA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/005891

Fecha 06/08/2009

Publicación Internacional No. WO 2010/015423 A2

Fecha 11/02/2010

⑥

Título (54)

METODOS PARA LA CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE FIBRAS
VEGETALES

⑦

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

EP

08/08/2008

08014211,0

US

11/08/2008

61/188,613

⑨

Comprobantes de pago Nos. 11-0013359 y 11-0013361

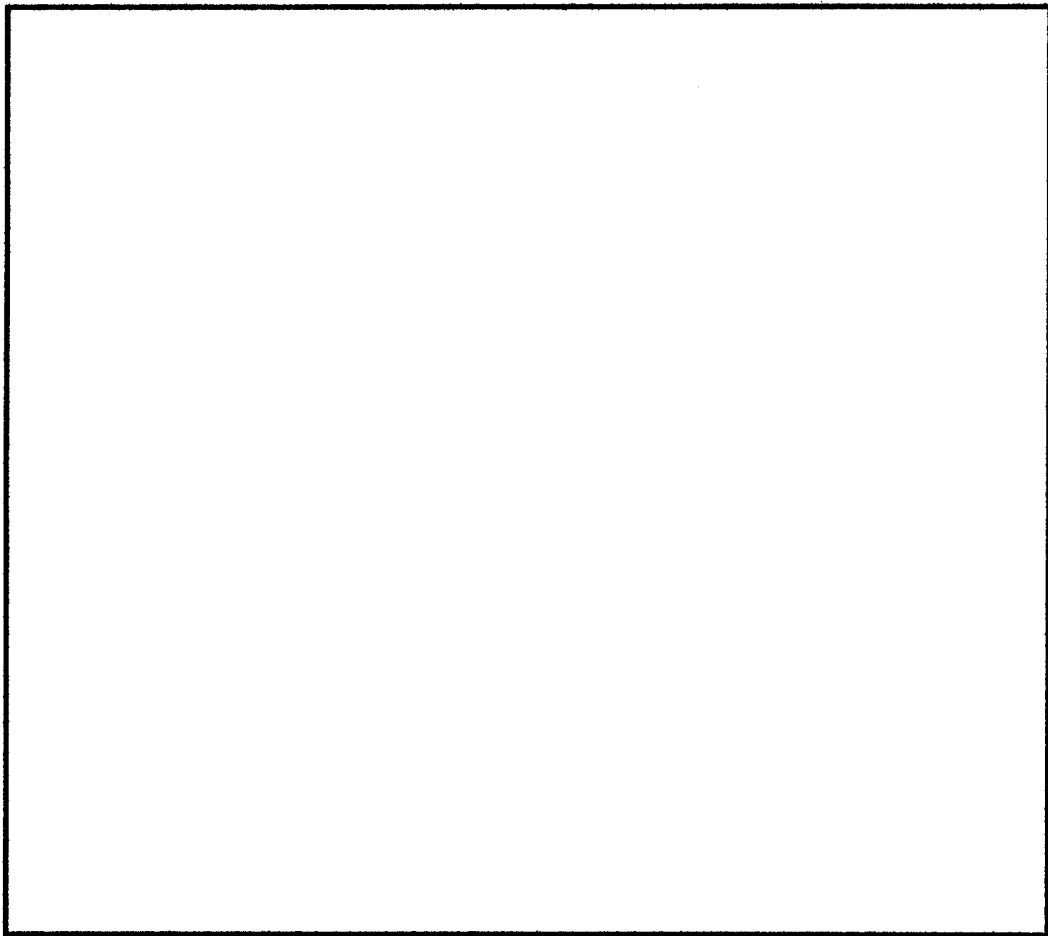
Fecha Febrero 14 de 2011

trucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

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

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUIS PATIÑO LEYVA

FIRMA:

Luis Patiño Leyva

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

02 MAR. 2011

P20278
000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0013359

Bogotá D.C., Febrero 14 de 2011 - 14:04:42

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387648796	14/02/2011	6.178.800.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387648800	14/02/2011	3.209.000.00

*** Conceptos Pagados ***

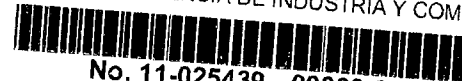
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-025439- -00000-0000

Fecha: 2011-03-02 14:33:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 14 de 2011 - 14:04:44

000001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0013361

Bogotá D.C., Febrero 14 de 2011 - 14:04:42

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387648796	14/02/2011	6.178.800.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387648800	14/02/2011	3.209.000.00

*** Conceptos Pagados ***

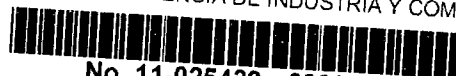
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	405.000.00	405.000.00
				\$405.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-025439- -00000-0000

Fecha: 2011-03-02 14:33:56 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 14 de 2011 - 14:04:44

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 February 2010 (11.02.2010)

PCT

(10) International Publication Number

WO 2010/015423 A2

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/005891

(22) International Filing Date:

6 August 2009 (06.08.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

08014211.0	8 August 2008 (08.08.2008)	EP
61/188,613	11 August 2008 (11.08.2008)	US

(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): ARIOLI, Antonio [US/US]; 7307 93rd Street, Lubbock, TX 79424 (US). ENGELN, Steven [BE/BE]; Knaptandstraat 14 - Bus W2, B-9160 Lokeren (BE).

(74) Common Representative: BAYER BIOSCIENCE N.V. et al.; 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: METHODS FOR PLANT FIBER CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION

(57) Abstract: Methods are provided for the isolation of biological macromolecules including peptides, proteins, and nucleic acids from mature plant fibers such as cotton fibers and from textiles. The biological macromolecules can be used to characterize the plant fiber (source, origin, genomic composition of producing plant etc.).

METHODS FOR PLANT FIBER CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION

Field of the invention

[1] The current invention relates to methods for isolating biological macromolecules including peptides, proteins, and nucleic acids from mature plant fibers such as cotton fibers. The plant fibers may have been processed into yarns, which in turn may be woven or knitted to fabric or finished apparel, prior to the isolation of the biological macromolecules. Since the isolated macromolecules contain information encoded in the sequence of their building blocks, these macromolecules isolated from plant fibers according to the currently described methods may be conveniently used to characterize the plant fiber or identify the origin or source of the plant fiber. The resulting information may be used e.g. in identity preservation programs for special plant fibers, certification of origin of plant fibers or even in reconstruction of breeding pedigrees using historical sources of plant fibers.

Background of the invention

[2] Plant fibers form a source for economically important products such as paper, cordage (cords and ropes) and textiles. A fiber is botanically defined as a long narrow tapering cell, dead and hollow at maturity with a rigid thick cell wall composed mostly of cellulose and usually lignin. Soft or bast fibers are found in the phloem (inner bark) of dicotyledonous stems (flax, jute, hemp, ramie). Hard or leaf fibers are found in monocot leaf vascular bundles (sisal, manilla hemp, pineapple). Surface fibers grown from the surface of seeds (cotton), leaves or fruits (coconut coir).

[3] Cotton provides much of the high quality fiber for the textile industry and major efforts have been invested in obtaining cotton fibers with characteristics which suit the

requirements of the industry through breeding by either classical methods or by genetically altering the genome of cotton plants.

[4] Cotton fiber originates as a seed trichome, more specifically a single cell that initiates from the epidermis of the outer integument of the ovules, at or just prior to anthesis. The morphological development of cotton fibers has been well documented (Basra and Malik, 1984, *Int Rev of Cytology* 89: 65–113; Graves and Stewart, 1988, *supra*; Ramsey and Berlin, 1976, *American Journal of Botany* 63 (6): 868–876; Ruan and Chourey, 1998, *Plant Physiology* 118: 399–406; Ruan et al. 2000, *Aust. J. Plant Physiol.* 27:795–800; Stewart, 1975, *Am. J. Bot.* 62, 723–730). Cotton fibers, in particular from *Gossypium hirsutum*, undergo four overlapping developmental stages: fiber cell initiation, elongation, secondary cell wall biosynthesis, and maturation. Fiber cell initiation is a rapid process. White fuzzy fibers begin to develop immediately after anthesis and continue up to about 3 days post-anthesis (DPA), which is followed by fiber cell elongation (until about 10 to about 17 DPA). Depending upon growth conditions, secondary cell wall biosynthesis initiates and continues to about 25 to about 40 DPA, followed by a maturation process until about 45 to about 60 DPA. The secondary cell wall synthesis and maturation phase are commonly considered the “fiber strength building phase”. Only about 25 to 30% of the epidermal cells differentiate into the commercially important lint fibers (Kim and Triplett, 2001). The majority of cells does not differentiate into fibers or develop into short fibers or fuzz. During fiber elongation and secondary wall metabolism, the fiber cells elongate rapidly, synthesize secondary wall components, and show dramatic cellular, molecular and physiological changes. Fiber elongation is coupled with rapid cell growth and expansion (Seagull, 1991. In *Biosynthesis and biodegradation of cellulose* (Haigler, C. H. & Weimer, P. J., eds) pp. 143–163, Marcel Dekker, New York) and constant synthesis of a large amount of cell metabolites and cell wall components such as cellulose. About 95% of the dry-weight in mature cotton fibers is cellulose (Pfluger and Zambryski, 2001, *Curr Biol* 11: R436–R439; Ruan et al., 2001, *Plant Cell* 13: 47–63). Non-celluloid components are also important to fiber cell development (Hayashi and Delmer, 1988, *Carbohydr. Res.* 181: 273–277; Huwyler et al., 1979, *Planta* 146: 635–642; Meinert and Delmer, 1977, *Plant Physiol* 59:

1088-1097; Peng *et al.*, 2002, *Science* 295: 147–150). Compared to other plant cells, cotton fibers do not contain lignin in secondary walls but have large vacuoles that are presumably related to rapid cell growth and expansion (Basra and Malik, 1984, *supra*; Kim and Triplett, 2001, *Plant Physiology* 127: 1361–1366; Mauney, 1984, *supra*; Ruan and Chourey, 1998, *supra*; Ruan *et al.*, 2000, *supra*; Van 't Hof, 1999, *American Journal of Botany* 86: 776–779).

[5] Developing cotton fiber cells are living cells and accordingly contain biological macromolecules such as peptides, proteins, and nucleic acids such as DNA and RNA. In contrast, mature fibers are dead, hollow cells, consisting mainly of cellulose. It is generally accepted that fiber cells, particularly cotton fiber cells, no longer contain extractable nucleic acids or proteins. Based on this inertness, cotton swabs are used as an applicator for medical substances as well as to take DNA samples from, most commonly, the inner cheek in forensic investigations.

[6] In addition, plant fibers are subject to extensive processing prior to their use in industry, particularly prior to their use in the textile industry. In the case of cotton, processing from raw fiber in the field to finished apparel for sale involves numerous steps that vary greatly depending on the end product desired. The various possible steps in these processes can be divided generally into mechanical and chemical steps.

[7] The process of harvesting and ginning cotton can subject the fiber to thermal and mechanical damage. No chemicals are applied during the ginning process. Heat is often utilized to dry cotton during the ginning process if it contains more than 8% moisture. Heat is usually closely regulated to avoid fiber damage. Mechanical damage can occur during the picking and ginning operations. This mechanical damage should affect a very low % of the total fibers.

[8] During spinning, the process steps are primarily mechanical. Short fibers (immature and/or mechanically damaged fibers and foreign material are removed in the spinning process). The first chemical treatments in processing are made toward the end of

the spinning process when yarn for knitting is treated with a lubricant and about half the yarn for weaving is treated with sizing material. Cotton yarn for knitting is most often treated with wax as a lubricant to facilitate movement of the yarn through the knitting equipment. Synthetic lubricants are also available but it is believed wax is still the most common treatment. Sizing, also called slashing, is applied to the yarn for weaving that will be used as the lengthwise strands in the finished fabric (the warp). The lateral (fill) yarn is not treated with sizing. The common material used for sizing is starch. Polyvinyl alcohol is also used for sizing and blends of starch and polyvinyl alcohol are common. Additives such as binders, humectants, softeners, wetting agents, defoamers and other adjuvants may be added to the sizing treatment.

[9] Knitting and weaving are both mechanical processes involving no chemical or heat applications. At the end of the knitting and weaving processes, steps to prepare the resulting fabric for finishing involve the application of chemicals and in some cases, high temperatures. The preparation process objective of the finishing step is to remove impurities that will interfere with processing through dyeing, printing or other finishing steps. Primarily, the wax must be removed from knitted fabric (scouring) and the sizing must be removed from woven fabric (desizing). Other impurities that may be removed at this step include, seed husks, pectins and other chemicals. Chemicals used for desizing include enzymes to remove starch and soda, ash or detergents to remove polyvinyl alcohol. Scouring is done with organic solvents that will dissolve the wax or other lubricants used. After scouring or desizing, fabric is usually bleached using chlorine or peroxide bleach. Goals of bleaching are to remove any remaining non-fibrous material, hydrolysis, oxidation and removal of residual sizeing and improve absorbancy of dye. Bleaching with peroxide may involve steam or water bath at near boiling water temperatures and the bleach bath may contain additives such as stabilizers and sequestering agents. Bleaching with chlorine is done at lower temperatures (40 to 50 degrees Centegrade) and cellulose degradation is less than with peroxide. If chlorine is used for bleaching, an antichlor treatment is also required. Singeing with a controlled flame is carried out on some fabrics to clean the fabric surface and remove or reduce pilling. Optical brighteners may be added to fabrics or garments to be sold as white un-

dyed products. Anionic organic optical brighteners are typically used on cotton. Several compounds are available and some can be added during bleaching.

[10] Mercerization is a process that can be applied to cotton yarn or fabric to improve absorption of or reaction to dye and other chemical finishing treatments, improve breaking strength, improve dimensional stability, improve fabric smoothness and luster and cover immature cotton fibers. It is a process that involves treatment with NaOH, washing, acid scouring, rinsing and drying.

[11] The most common finishing treatment is dyeing. It can be done at the yarn, fabric or garment stage. Dyes used for cotton are numerous and of many different types. The most common dye product for cotton is indigo but it represents only 4% of dyed fabric. Dyeing can be done as a continuous process or batch process. While the chemicals used for dyeing are numerous, the process customarily involves the use of high temperature, near boiling, in the dye vat to which the fabric, yarn or garments may be submersed for extended time. Printing is the other major process for adding color or design to textiles. Printing involves mostly a mechanical process for applying coloring inks to the surface of fabric or garments. Both dyeing and printing may involve the application of chemical fixing agents at the end of the process.

[12] Another common finishing treatment, especially after dyeing is aggressive laundering. This would include use of detergents and other cleaning agents to remove residual finishing materials from the finished fabric or garment.

[13] Many other mechanical and chemical finishing steps may be applied to fabric, yarn or garments involving numerous options of chemicals and treatment processes. Softeners alone may be of three different types and each type may involve several different chemicals.

[14] Although the above overview of converting raw cotton fiber into end use textile products is highly generalized, it will be clear that a person skilled in the art would not

expect to be able to extract peptides, proteins or nucleic acids from yarns, textiles or finished apparel products after the numerous chemical and thermal treatment steps customarily involved.

[15] There is a need in the industry to be able to track the source and/or origin of plant fibers, particularly of mature and/or processed plant fibers. Such source and/or origin identification of plant fibers may be important for certification processes, guaranteeing production and processing of fibers of specified quality produced from specific germplasm, such as the FiberMax® Certification Program (www.certifiedfibermax.com). The capacity to track source and/or origin in mature and/or processed fibers also allows identification of plant fibers which have special characteristics, such as the fibers with improved chemical reactivity or dyeability as described in WO2006/136351.

[16] Existing certification programs are based on recordation by growers or seed retailers of purchase of seeds of specific germplasm of a fiber crop, such as cotton, and identification of the produced fibers of the registered growers (in the case of cotton by permanent USDA bale identification numbers).

[17] The ability to track source and/or origin of plant fibers, particularly of mature and/or processed fibers would be greatly improved if it would be possible to extract biological macromolecules from mature and or processed plant fibers which contain biological information related to the source plant of the fibers, such as peptides, proteins, nucleic acids, DNA or RNA. In this way, auditing of existing certification programs would be made possible. Additionally it would become possible to identify fibers at a later stage in the supply chain, beyond the growers or suppliers of fibers, such as e.g. at spinner, weaver or retail customer level.

[18] Agricultural Research Service, USDA and Applied DNA Sciences worked together to develop a tagging system based on DNA embedded technologies to trace US-sourced cotton and textile components.
(<http://seedquest.com/News/releases/2004/February/7829.htm>).

[19] It would thus be advantageous to be able to extract naturally occurring biological macromolecules from plant fibers, such as cotton fibers, particularly from mature and/or processed fibers, textiles, yarns or apparel, and further to be able to derive plant source related information from such plant fibers.

[20] The methods described hereinafter in the different embodiments, examples, figures and claims provide a solution to the above mentioned problem, by allowing to extract natural biological macromolecules from plant fibers, such as cotton fibers, particularly from mature and/or processed fibers, textiles, yarns or apparel, and further to be able to derive plant source related information from such plant fibers.

Summary of the invention

[21] In one embodiment, the invention provides a method for characterizing a mature plant fiber or a processed plant fiber, such as a seed fiber or cotton fiber comprising the steps of isolating from said plant fiber a biological macromolecule naturally occurring in said plant fiber other than polysaccharides or lignin; and characterizing the information encoded in the sequence of the monomers of said biological macromolecule.

[22] In another embodiment of the invention, the invention provides a method for identifying a mature plant fiber or a processed plant fiber, such as a seed fiber or cotton fiber comprising the steps of isolating from said plant fiber a biological macromolecule naturally occurring in said plant fiber other than polysaccharides or lignin; and subjecting said biological macromolecule to a detection assay specific for said plant fiber.

[23] In one embodiment the biological macromolecule may be a polypeptide, protein, nucleic acid, DNA, RNA, single stranded RNA or double-stranded RNA.

[24] In another embodiment the detection assay may be a polymerase chain reaction based detection assay, an antibody based detection assay, or a nucleic acid hybridization based detection assay.

[25] In yet another embodiment, the detection assay may detect the presence or absence of chimeric genes present in the genome of the plant producing the fibers. The chimeric gene may comprise a coding region or part or an antisense portion thereof selected from N-acetylglucosamine transferase, phosphotricinacetyltransferase, EPSPS, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, an insecticidal portion of *Bacillus thuringiensis* crystal protein, poly(ADP-ribose) polymerase, poly(ADP-ribose) glucosyltransferase, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase, glucanase, cellulose synthase, chitinase, expansin, callose synthase, kinase, nicotinamidase, nicotinate phosphoribosyltransferase, nicotinic acid mononucleotide adenylyl transferase, nicotinamide adenine dinucleotide synthetase or

nicotine amide phosphorybosyltransferase. The detection assay may also be an event-specific detection assay.

[26] In still another embodiment of the invention, the detection assay may detect the presence or absence of specific alleles present in the genome of the plant producing the fibers.

[27] In yet another embodiment of the invention, the fiber from which the biological macromolecule is isolated is present in yarns, fabric, tissue or finished apparel.

[28] The invention further provides a method for analyzing the genome of a fiber producing plant comprising the steps of isolating nucleic acids from mature or processed fibers of said plant, said nucleic acids being naturally occurring in said plant fiber; and subjecting said nucleic acid to a genome analysis protocol. The method may be applied to old mature fibers, or old yarns, fabrics or finished apparel.

[29] Yet another embodiment of the invention is a method for isolating nucleic acid such as DNA from mature plant fibers or processed plant fibers comprising the steps of incubating said plant fibers in a buffer containing detergents, proteases and salts for a prolonged time, preferably for a period of 4 to 100 hours; and processing said lysis buffer according to standard nucleic acid isolation methods and isolating said DNA.

[30] In another embodiment of the invention, a method is provided for isolating nucleic acid, such as DNA, from woven or knitted fabric comprising the steps of unweaving the threads of said fabric; incubating said threads in a buffer containing detergents, proteases and salts for a prolonged time, preferably for a period of 4 to 100 hours; and processing said lysis buffer according to standard nucleic acid isolation methods and isolating said nucleic acid.

[31] In yet another embodiment of the invention, a method is provided for isolating nucleic acid, such as DNA, from harvested mature plant fibers comprising the steps of

removing leaf and stem trash material from the harvested mature plant fibers; incubating said plant fibers in a buffer containing detergents, proteases and salts for a prolonged time, preferably for a period of 4 to 100 hours; and processing said lysis buffer according to standard nucleic acid isolation methods and isolating said nucleic acid.

[32] The invention also provides for the use of a method according to the invention in a process to certify the identity of traded plant fibers.

[33] The invention further provides a method to determine the relative amounts of different plant fibers in a mixture of mature or processed plant fibers comprising the steps of isolating from said mixture of plant fibers a biological macromolecule naturally occurring in said plant fibers other than polysaccharides or lignin; subjecting said biological macromolecule to detection assays specific for each of said plant fibers; and determining the relative amount of each of the fibers.

[34] In another embodiment of the invention, a method is provided to certify the identity of traded cotton fibers, said method comprising recording purchase of certified cotton seeds by registered growers, said cotton seed comprising a specific genome composition and producing a particular brand of cotton fibers; registering bales of raw cotton fibers produced by said registered growers from said certified cotton seed as said particular brand of cotton fibers; authenticating said bales by cross checking with said seed purchase records; providing said registered bales to mills to produce yarns, fabrics or apparel from said brand of cotton fibers, preferably predominantly, particularly exclusively from said brand of cotton fibers; and auditing the identity of said brand of cotton fibers at one or more steps using a protocol as herein described.

Brief description of the drawings

Figure 1: PCR amplification of GhGluc1 on nucleic acids templates isolated from mature cotton fiber material (*Gossypium hirsutum* FM966). Lane 1: molecular weight marker; lane 2: template DNA from purified fibers (1 μ l); lane 3: template DNA from unpurified fibers containing leaf trash (1 μ l); lane 4: template DNA from leaf trash only (1 μ l); lane 5: template DNA from purified fibers (5 μ l); lane 6: template DNA from unpurified fibers containing leaf trash (5 μ l); lane 7: template DNA from leaf trash only (5 μ l); lane 8: no template control; lane 9: positive control – genomic DNA isolated from FiberMax966 (FM966) plant material.

Figure 2: PCR amplification of GhGluc1 on nucleic acids templates isolated from mature *Gossypium hirsutum* FM966 cotton fiber material and from 4 year old *Gossypium barbadense* Pima Y5 cotton fiber material. Lane 1: molecular weight marker; lanes 2-3: template DNA from FM966 purified fibers containing no leaf trash (5 μ l); lanes 4-5: template DNA from FM966 unpurified fibers containing leaf trash (5 μ l); lane 6: template DNA from FM966 leaf trash containing no fiber material (5 μ l); lanes 7-8: template DNA from Pima Y5 purified fibers containing no leaf trash (5 μ l); lane 9: no template control; lane 10: positive control – genomic DNA isolated from FiberMax966 plant material.

Figure 3: PCR amplification of GhGluc1 on nucleic acids templates isolated through various protocols. Lane 1: molecular weight marker; lane 2: template DNA isolated by DNeasy® Plant Mini Kit (5 μ l); lane 3: template DNA isolated by DNeasy® Plant Mini Kit (1 μ l); lane 4: template DNA isolated by DNeasy® Plant Mini Kit (1 μ l); lane 5: template DNA isolated by DNeasy® Plant Mini Kit (5 μ l); lane 6: template DNA isolated by Wizard® Genomic DNA Purification Kit (1 μ l); lane 7: template DNA isolated by Wizard® Genomic DNA Purification Kit (5 μ l); lane 8: template DNA isolated by Wizard® Genomic DNA Purification Kit (1 μ l); lane 9: template DNA isolated by Wizard® Genomic DNA Purification Kit (5 μ l); lane 10: template DNA isolated by CTAB-procedure (1 μ l); lane 11: template DNA isolated by CTAB procedure (5 μ l); lane

12: no template control; lane 13: positive control – genomic DNA isolated from FiberMax966 plant material.

Figure 4: PCR amplification of GhGluc1 on nucleic acids templates isolated cotton cloth. Lanes 1 and 8: : molecular weight marker; lane 2: template DNA from cotton cloth (ON incubation) (1 μ l); lane 3: template DNA from cotton cloth (30' incubation) (1 μ l); lane 4: template DNA from cotton cloth (ON incubation) (5 μ l); lane 5: template DNA from cotton cloth (30' incubation) (5 μ l); lane 6: no template control; lane 7: positive control – genomic material isolated from FiberMax966 plant material.

Figure 5: PCR amplification of GhGluc1 on nucleic acids templates isolated from cotton shirts with different weaves (knitted or woven). Lane 1: molecular weight marker; lane 2: template DNA from woven cotton shirt, ON incubation, (1 μ l); lane 3: template DNA from woven cotton shirt, ON incubation, (5 μ l); lane 4: template DNA from woven cotton shirt, ON incubation, (1 μ l); lane 5: template DNA from woven cotton shirt, ON incubation, (5 μ l); lane 6: template DNA from knitted cotton shirt, ON incubation, (1 μ l); lane 7: template DNA from knitted cotton shirt, ON incubation, (5 μ l); lane 8: template DNA from knitted cotton shirt, ON incubation, (1 μ l); lane 9: template DNA from knitted cotton shirt, ON incubation, (5 μ l); lane 10: template DNA from woven cotton shirt, 6 days incubation, (1 μ l); lane 11: template DNA from woven cotton shirt, 6days incubation, (5 μ l); lane 12: template DNA from woven cotton shirt, 6 days incubation, (1 μ l); lane 13: template DNA from woven cotton shirt, 6days incubation, (5 μ l); lane 14: template DNA from knitted cotton shirt, 6 days incubation, (1 μ l); lane 15: template DNA from knitted cotton shirt, 6days incubation, (5 μ l); lane 16: template DNA from knitted cotton shirt, 6days incubation, (1 μ l); lane 17: template DNA from knitted cotton shirt, 6 days incubation, (5 μ l); lane 18: no template control; lane 19: positive control – genomic DNA isolated from FiberMax966 plant material.

Figure 6: PCR amplification of NodC on nucleic acids templates isolated from mature transgenic cotton fiber material containing a chimeric N-acetylglucosamine transferase encoding gene. Lane 1: template DNA from transgenic fiber material, duplicate 1 (1 μ l);

Lane 2: template DNA from transgenic fiber material, duplicate 1 (5 μ l); Lane 3: template DNA from transgenic fiber material, duplicate 2 (1 μ l); Lane 4: template DNA from transgenic fiber material, duplicate 2 (5 μ l); lane 5: no template control; lane 6: positive control – genomic DNA isolated from transgenic cotton plant material; lane 7: molecular weight marker.

Figure 7: Graphic representation of the endpoint Taqman assay discriminating between the GhGluc1 A subgenome allele from *Gossypium hirsutum* and from *Gossypium barbadense*. Genomic DNA samples prepared from Pima (*G. barbadense*) or FM966 (*G. hirsutum*) plant (leaf) material, either in pure form, or in mixes of various ratio's (75/25, 50/50 and 25/75), subjected to a TaqMan detection assay. The X axis indicates the presence of the *hirsutum* allele of Gluc1, while the Y-axis indicates the presence of the *barbadense* allele of Gluc1. In the mixed DNA samples, the Taqman analysis allows the detection of the various ratio's of both alleles.

Figure 8: Graphic representation of the endpoint Taqman assay discriminating between the GhGluc1 A subgenome allele from *Gossypium hirsutum* and from *Gossypium barbadense* on fiber material and polo shirt textile. Genomic DNA samples prepared from Pima (*G. barbadense*) or FM966 (*G. hirsutum*) plant (leaf) material, either in pure form, or in mix of 50/50 as control samples. Nucleic acids prepared from fiber material (FM966 Bale) or from textile material (polo) was subjected to a TaqMan detection assay. The X axis indicates the presence of the *hirsutum* allele of Gluc1, while the Y-axis indicates the presence of the *barbadense* allele of Gluc1. In the analysis only the *hirsutum* allele was detected, indicating that all fiber material and all textile material contains only *hirsutum* type fibers.

Detailed description of embodiments of the invention

[35] The currently described methods are based on the unexpected finding that it is possible to extract biological macromolecules (other than polysaccharides) such as peptides, proteins, nucleic acids, DNA or RNA from mature and/or processed plant fibers, particularly from seed fibers such as cotton fibers. Moreover, the isolated DNA proved to be of sufficient quality to be usable for further processing allowing characterization of the fibers e.g. using detection assays, such as polymerase chain reaction based amplifications.

[36] Thus, in a first embodiment, the invention provides a method for a mature plant fiber or a processed plant fiber comprising the steps of isolating from said plant fiber a biological macromolecule naturally occurring in said plant fiber other than polysaccharides or lignin; and characterizing the information encoded in the sequence of the monomers of said biological macromolecule.

[37] As used herein, a "mature plant fiber" is a fiber which has completed its developmental cycle and is considered to be the remnant of a dead cell. In particular, a mature plant fiber is a plant fiber after it has been harvested from the fiber crop producing the plant fiber. For cotton e.g., a mature fiber would be considered the fibers as they are present in the cotton balls picked at harvest. It will be clear that a mature plant fibers comprises all plant fibers processed by the fiber industry.

[38] A "processed plant fiber" as used herein, is a mature plant fiber as harvested from the plant crop, which has undergone additional mechanical, heat and/or chemical treatments including waxing, dying, carding, spinning, weaving, sizing, mercerization etc. (see background section).

[39] "Plant fibers", as used herein, are long narrow tapering cells of plant origin, dead and hollow at maturity with a rigid thick cell wall composed mostly of cellulose and lignin.

[40] "Seed fibers" as used herein are fibers grown from the surface of seeds such as cotton. "Cotton" as used herein includes *Gossypium hirsutum* or *Gossypium barbadense* including "Cotton progenitor plants" such as *Gossypium arboreum*, *Gossypium herbaceum* and *Gossypium raimondii* and *Gossypium longicalyx*.

[41] A "biological macromolecule naturally occurring in a plant fiber cell" is a biological macromolecule which has not been added exogenously to said plant fiber, e.g. through incubation or injection with a molecule such as a foreign DNA molecule, peptide or protein to tag the plant fibers, and which includes all macromolecules, i.e. molecules of polymeric nature which have an informational content. The informational content will usually be encoded in the sequence of the building blocks or monomers. Examples of biological macromolecules are polypeptides, proteins, nucleic acids such as DNA or RNA, be they single-stranded or double stranded.

[42] "Characterizing a biological macromolecule" as used herein means to decode the informational content of the biological macromolecule. This can be conveniently done by subjecting the biological macromolecule to a series of analyses, including determining the sequence of monomers of which the macromolecule is composed, but also subjecting the biological macromolecule to one or more specific detection assays.

[43] A "detection assay" as used herein is a method or protocol targeted at finding a specific sequence of monomers in a biological macromolecule. This may include detection assays based on polymerase chain reaction based amplification, antibody detection or nucleic acid hybridization.

[44] It has been demonstrated that the particular extraction methods, while having an influence on the quality of the extracted biological macromolecule are not critical to the ability of being able to extract such biological macromolecules from plant fibers.

[45] Nevertheless, it has been unexpectedly found that the quality and/or the quantity of the biological macromolecules, particularly the nucleic acid fraction thereof, isolated from mature and/or processed plant fibers can be greatly by several measures.

[46] It may e.g. be advantageous to leave the plant fibers to be analyzed for a prolonged time in a lysis buffer containing detergents and possibly other constituents. In particular it has been found that incubating mature and/or processed plant fibers for a period of at least 30 minutes, but more preferably for a period of at least 4 hrs up to 120 hrs in a lysis buffer, preferably at room temperature will improve the yield of recovered biological macromolecules, particularly the nucleic acid fraction thereof.

[47] It has also be determined that carefully removing impurities, including leaf remnants, resins and other trashes from the plant fibers, such as harvested and/or ginned cotton fibers, prior to isolation of the biological macromolecules, greatly improves the quality of the isolated nucleic acids, particularly with regard to further analysis and processability of the isolated nucleic acids

[48] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from plants containing transformation events, or combination of transformation events, that may be the subject of petitions for non-regulated status, in the United States of America, to the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) of the United States Department of Agriculture (USDA) whether such petitions are granted or are still pending, including the following events:

Transformation event	Petition	Transgenic phenotype
COT67B	07-108-01p	lepidopteran resistant
GHB614	06-332-01p	glyphosate tolerant
MON88913	04-086-01p	glyphosate tolerant
COT102	03-155-01p	lepidopteran resistant
281-24-236	03-036-01p	lepidopteran resistant
3006-210-23	03-036-02p	lepidopteran resistant
LLCotton25	02-042-01p	phosphinotricin tolerant

MON15985	00-342-01p	lepidopteran resistant
31807&31808	97-013-01p	bromoxynil tolerant & lepidopteran resistant
19-51a	95-256-01p	Sufonylurea tolerant
MON 1445, 1698	95-045-01p	glyphosate tolerant
MON 531,757,1076	94-308-01p	lepidopteran resistant
BXN	93-196-01p	bromoxynil tolerant

[49] To this end the biological macromolecules, particularly the nucleic acid such as DNA may be subjected to a detection assay specifically designed to detect the transformation events. Such detection assays include the assays published on <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm> at least for events MON1445, MON531, MON15985, LLCotton25, 3006-210-23 and 281-24-236. Additional information such as nucleotide sequences of the plant flanking sequence adjacent to the inserted DNA in these transformation events (upon which information specific DNA detection assays can be designed) can be found in the following patent applications:

Event name	Phenotype	Patent application
CE43-67B	Insect resistance (Cry1Ab)	WO2006/128573
CE46-02A	Insect resistance (Cry1Ab)	WO2006/128572
CE44-69D	Insect resistance (Cry1Ab)	WO2006/128571
1143-14A	Insect resistance (Cry1Ab)	WO2006/128569
T342-142	Insect resistance (Cry1Ab)	WO2006/128568
event3006-210-23	Insect resistance (Cry1Ac)	WO2005103266
PV-GHGT07 (1445)	Glyphosate tolerance	US2004-148666
MON88913	Glyphosate tolerance	WO2004/072235
EE-GH3	Glyphosate tolerance	WO2007/017186
T303-40	Insect-resistance	PCT/EP2008/002667
GHB119	Insect-resistance	PCT/EP2008/004652
Cot202	Insect resistance (VIP3)	US2007-067868
LLcotton25	Glufosinate resistance	WO2007/017186

event 281-24-236	Insect resistance (Cry1F)	WO2005103266
Cot102	Insect resistance (Vip3A)	US2006-130175
MON15985	Insect resistance	US2004-250317

[50] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from cotton plants containing genetic material which imparts particularly advantageous, useful traits to these plants. Examples of such traits are better plant growth, increased tolerance to abiotic stresses such as high or low temperatures, drought, extreme water or salt or mineral content in the soil, increased flowering performance, easier harvesting, accelerated maturation, higher harvest yields of commercially relevant plant parts (e.g. seeds), higher quality and/or a higher nutritional value of the harvested products, better storage stability and/or processability of the harvested products. Further and particularly emphasized examples of such traits are resistance against biotic stresses i.e. a better defense of the plants against animal and microbial pests, such as against insects, mites, phytopathogenic fungi, bacteria and/or viruses, and also increased tolerance of the plants to certain herbicidally active compounds.

[51] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from cotton plants containing genetic material which imparts herbicide-resistance for example glyphosate-tolerant plants, i.e. plants made tolerant to the herbicide glyphosate or salts thereof. Plants can be made tolerant to glyphosate through different means. For example, glyphosate-tolerant plants can be obtained by transforming the plant with a gene encoding the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). Examples of such EPSPS genes are the AroA gene (mutant CT7) of the bacterium *Salmonella typhimurium* (Comai et al., 1983, Science 221, 370-371), the CP4 gene of the bacterium *Agrobacterium* sp. (Barry et al., 1992, Curr. Topics Plant Physiol. 7, 139-145), the genes encoding a *Petunia* EPSPS (Shah et al., 1986, Science 233, 478-481), a *Tomato* EPSPS (Gasser et al., 1988, J. Biol. Chem. 263, 4280-4289), or an *Eleusine* EPSPS (WO 01/66704). It can also be a mutated EPSPS as

described in for example EP 0837944, WO 00/66746, WO 00/66747 or WO02/26995. Glyphosate-tolerant plants can also be obtained by expressing a gene that encodes a glyphosate oxido-reductase enzyme as described in U.S. Patent Nos. 5,776,760 and 5,463,175. Glyphosate-tolerant plants can also be obtained by expressing a gene that encodes a glyphosate acetyl transferase enzyme as described in for example WO 02/36782, WO 03/092360, WO 05/012515 and WO 07/024782. Glyphosate-tolerant plants can also be obtained by selecting plants containing naturally-occurring mutations of the above-mentioned genes, as described in for example WO 01/024615 or WO 03/013226. Other herbicide resistant plants are for example plants that are made tolerant to herbicides inhibiting the enzyme glutamine synthase, such as bialaphos, phosphinothricin or glufosinate. Such plants can be obtained by expressing an enzyme detoxifying the herbicide or a mutant glutamine synthase enzyme that is resistant to inhibition. One such efficient detoxifying enzyme is an enzyme encoding a phosphinothricin acetyltransferase (such as the bar or pat protein from *Streptomyces* species). Plants expressing an exogenous phosphinothricin acetyltransferase are for example described in U.S. Patent Nos. 5,561,236; 5,648,477; 5,646,024; 5,273,894; 5,637,489; 5,276,268; 5,739,082; 5,908,810 and 7,112,665. Further herbicide-tolerant plants are also plants that are made tolerant to the herbicides inhibiting the enzyme hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD). Hydroxyphenylpyruvate dioxygenases are enzymes that catalyze the reaction in which para-hydroxyphenylpyruvate (HPP) is transformed into homogentisate. Plants tolerant to HPPD-inhibitors can be transformed with a gene encoding a naturally-occurring resistant HPPD enzyme, or a gene encoding a mutated HPPD enzyme as described in WO 96/38567, WO 99/24585 and WO 99/24586. Tolerance to HPPD-inhibitors can also be obtained by transforming plants with genes encoding certain enzymes enabling the formation of homogentisate despite the inhibition of the native HPPD enzyme by the HPPD-inhibitor. Such plants and genes are described in WO 99/34008 and WO 02/36787. Tolerance of plants to HPPD inhibitors can also be improved by transforming plants with a gene encoding an enzyme prephenate deshydrogenase in addition to a gene encoding an HPPD-tolerant enzyme, as described in WO 2004/024928. Still further herbicide resistant plants are plants that are made tolerant to acetolactate synthase (ALS) inhibitors. Known ALS-inhibitors include, for

example, sulfonylurea, imidazolinone, triazolopyrimidines, pyrimidinyoxy(thio)benzoates, and/or sulfonylaminocarbonyltriazolinone herbicides. Different mutations in the ALS enzyme (also known as acetohydroxyacid synthase, AHAS) are known to confer tolerance to different herbicides and groups of herbicides, as described for example in Tranel and Wright (2002, Weed Science 50:700-712), but also, in U.S. Patent No. 5,605,011, 5,378,824, 5,141,870, and 5,013,659. The production of sulfonylurea-tolerant plants and imidazolinone-tolerant plants is described in U.S. Patent Nos. 5,605,011; 5,013,659; 5,141,870; 5,767,361; 5,731,180; 5,304,732; 4,761,373; 5,331,107; 5,928,937; and 5,378,824; and international publication WO 96/33270. Other imidazolinone-tolerant plants are also described in for example WO 2004/040012, WO 2004/106529, WO 2005/020673, WO 2005/093093, WO 2006/007373, WO 2006/015376, WO 2006/024351, and WO 2006/060634. Further sulfonylurea- and imidazolinone-tolerant plants are also described in for example WO 07/024782.

[52] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from cotton plants containing genetic material which imparts resistance to attack by certain target insects. Such plants can be obtained by genetic transformation, or by selection of plants containing a mutation imparting such insect resistance and may contain at least one transgene comprising a coding sequence encoding:

- 1) an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* or an insecticidal portion thereof, such as the insecticidal crystal proteins listed by Crickmore et al. (1998, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 807-813), updated by Crickmore et al. (2005) at the *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, online at: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/), or insecticidal portions thereof, e.g., proteins of the Cry protein classes Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry2Ab, Cry3Aa, or Cry3Bb or insecticidal portions thereof; or
- 2) a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* or a portion thereof which is insecticidal in the presence of a second other crystal protein from *Bacillus thuringiensis* or a portion thereof, such as the binary toxin made up of the Cry34 and Cry35 crystal proteins (Moellenbeck et al. 2001, Nat. Biotechnol.

- 19: 668-72; Schnepf et al. 2006, Applied Environm. Microbiol. 71, 1765-1774); or
- 3) a hybrid insecticidal protein comprising parts of different insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*, such as a hybrid of the proteins of 1) above or a hybrid of the proteins of 2) above, e.g., the Cry1A.105 protein produced by corn event MON98034 (WO 2007/027777); or
 - 4) a protein of any one of A1) to A3) above wherein some, particularly 1 to 10, amino acids have been replaced by another amino acid to obtain a higher insecticidal activity to a target insect species, and/or to expand the range of target insect species affected, and/or because of changes introduced into the encoding DNA during cloning or transformation, such as the Cry3Bb1 protein in corn events MON863 or MON88017, or the Cry3A protein in corn event MIR604;
 - 5) an insecticidal secreted protein from *Bacillus thuringiensis* or *Bacillus cereus*, or an insecticidal portion thereof, such as the vegetative insecticidal (VIP) proteins listed at: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, e.g., proteins from the VIP3Aa protein class; or
 - 6) a secreted protein from *Bacillus thuringiensis* or *Bacillus cereus* which is insecticidal in the presence of a second secreted protein from *Bacillus thuringiensis* or *B. cereus*, such as the binary toxin made up of the VIP1A and VIP2A proteins (WO 94/21795); or
 - 7) a hybrid insecticidal protein comprising parts from different secreted proteins from *Bacillus thuringiensis* or *Bacillus cereus*, such as a hybrid of the proteins in 1) above or a hybrid of the proteins in 2) above; or
 - 8) a protein of any one of 1) to 3) above wherein some, particularly 1 to 10, amino acids have been replaced by another amino acid to obtain a higher insecticidal activity to a target insect species, and/or to expand the range of target insect species affected, and/or because of changes introduced into the encoding DNA during cloning or transformation (while still encoding an insecticidal protein), such as the VIP3Aa protein in cotton event COT102.

[53] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from cotton plants containing genetic material which imparts tolerance to abiotic stresses. Such plants can be obtained by genetic transformation and may contain one or more of the following transgenes

- a. a transgene capable of reducing the expression and/or the activity of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) gene in the plant cells or plants as described in WO 00/04173 or EP 04077984.5 or EP 06009836.5.
- b. a stress tolerance enhancing transgene capable of reducing the expression and/or the activity of the PARP encoding genes of the plants or plants cells, as described e.g. in WO 2004/090140.
- c. a stress tolerance enhancing transgene coding for a plant-functional enzyme of the nicotinate adenine dinucleotide salvage synthesis pathway including nicotinamidase, nicotinate phosphoribosyltransferase, nicotinic acid mononucleotide adenyl transferase, nicotinamide adenine dinucleotide synthetase or nicotinate amide phosphoribosyltransferase as described e.g. in EP 04077624.7 or WO 2006/133827 or PCT/EP07/002433.

[54] The methods of the current invention can be advantageously used to identify cotton fibers derived from cotton plants containing genetic material which can modify the characteristics of the fiber such as strength, length, micronaire etc. including the chimeric genes described in WO05/017157 (glucanase silencing genes) WO04/0655571 (chitinase encoding genes), WO02/45485 and WO08/012058 (sucrose synthase genes), WO01/17333 (sucrose phosphate synthetase genes) WO98/00549 (cellulose synthase genes) WO06/133827 (N-acetylglucosamine transferase genes such a chitin synthase or NODC encoding genes).

[55] A further application for the methods of the current invention is to identify plant fibers, such as cotton fibers from plants which comprise specific allelic variations of

particular genes. The methods for identifying such allelic variations are well known in the art. In particular, such allelic variations may be used to differentiate between fibers from particular plant species such as e.g. differentiating between fibers from *G. barbadense* and *G. hirsutum*. As an example, the polymorphism between glucanase1 A subgenome allele from *Gossypium barbadense* and from *Gossypium hirsutum* (by the presence of a stop codon in the coding region of Gluc1 A subgenome allele in *G. barbadense*, as described in unpublished EP application 08075514.3 herein incorporated by reference) may be used to differentiate fibers originating from *Gossypium barbadense* or *Gossypium hirsutum*.

[56] The methods herein described may also be used to isolate nucleic acid templates which can be used for any genome characterization protocols, including AFLP, READS and the like. The nucleic acid templates isolated from the mature or processed fibers, may be amplified using methods known in the art such as whole genome amplification, prior to application of a genome characterization protocol.

[57] The methods described herein may also be used to assist in certification programs, guaranteeing the supply of commercially traded plant fibers, such as cotton fibers, having particularly specified characteristics. Usually, such certification programs include recordation of the purchase of certified seeds by registered growers, whereby the cotton seed comprise a specific genome composition and produce a particular brand of plant fibers. Bale of the harvested plant fibers produced by the registered growers from the said certified seeds are registered and authenticated by cross checking with said seed purchase records and are provided to mills to produce preferably predominantly, particularly exclusively yarns, fabrics or apparel from said brand of fibers. The methods describe herein allow to perform audits at different points in the supply chain.

[58] The methods described herein can also be applied to isolate biological macromolecules from hair-like (trichome-like) structures on plant seeds, such as the hairs on tomato seeds or the bear hairs on the basis of wheat seeds.

[59] The methods described herein can also be applied to characterize the nucleic acid material of old fibers and old textile material (e.g. fibers and textiles which are over 100 years old). Without limiting the invention to a specific mechanism or theory it is believed that one possibility that biological material is preserved in old fibers is because we have observed that mature fibers are twisted such that biological material is 'trapped' (and thereby 'preserved') in mature fibers.

[60] The methods described herein can also be applied in forensic applications because fiber or textile material identified at a crime scene can be characterized by for example preceding a whole genome amplification step as shown in example 6 in this application.

[61] As used herein "comprising" is to be interpreted as specifying the presence of the stated features, integers, steps 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 region, which is functionally or structurally defined, may comprise additional DNA regions etc.

[62] The following non-limiting Examples describe the methods for isolating biological macromolecules from mature plant fibers and from processed fibers and their use for characterizing or identifying plant fibers. Unless stated otherwise in the Examples, all recombinant DNA techniques are carried out according to standard protocols as described in Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY and in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Standard materials and methods for plant molecular work are described in *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R.D.D. Croy, jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK.

[63] Throughout the description and Examples, reference is made to the following sequences represented in the sequence listing:

SEQ ID No 1: oligonucleotide 1 for PCR amplification of Ghgluc1

SEQ ID No 2: oligonucleotide 2 for PCR amplification of Ghgluc1

SEQ ID No 3: oligonucleotide 1 for PCR amplification of NodC

SEQ ID No 4: oligonucleotide 2 for PCR amplification of NodC

SEQ ID No 5: oligonucleotide 1 for PCR amplification of expansin

SEQ ID No 6: oligonucleotide 2 for PCR amplification of expansin

SEQ ID No 7: oligonucleotide 1 for Taqman detection assay of GhGluc1 (forward primer)

SEQ ID No 8: oligonucleotide 2 for Taqman detection assay of GhGluc1 (reverse primer)

SEQ ID No 9: oligonucleotide 3 for Taqman detection assay of subenomic A GhGluc1 allele (VIC marked oligonucleotide detecting the *G. hirsutum* allele of Gluc1)

SEQ ID No 10: oligonucleotide 4 for Taqman detection assay of subenomic A GhGluc1 allele (FAM marked oligonucleotide detecting the *G. barbadense* allele of Gluc1)

SEQ ID No 11: oligonucleotide 1 for PCR amplification of rpl16

SEQ ID No 12: oligonucleotide 2 for PCR amplification of rpl16

SEQ ID No 13: oligonucleotide 1 for PCR amplification of matK

SEQ ID No 14: oligonucleotide 2 for PCR amplification of matK

SEQ ID No 15: oligonucleotide 1 for PCR amplification of trnT-trnL

SEQ ID No 16: oligonucleotide 2 for PCR amplification of trnT-trnL

SEQ ID No 17: oligonucleotide 1 for PCR amplification of ndhF

SEQ ID No 18: oligonucleotide 2 for PCR amplification of ndhF

Examples

Example 1: Isolation of nucleic acids from raw cotton fiber material.

A. Isolation of nucleic acids from *Gossypium hirsutum* FM966 fiber material.

[64] Harvested cotton fibers from FM966, which had been ginned and baled, were subjected to DNA extraction using the conventional CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide) procedure (Doyle and Doyle, 1987, Phytochem. Bull. 19, 11) for isolation of genomic DNA from plant material. Although a pellet of nucleic acids was obtained, this material could not be used for any further application including PCR amplification, or restriction enzyme digestion.

[65] The harvested baled raw cotton fibers still contain some impurities such as leaf remnants and other trashes. These contaminant materials were carefully removed by manual cleaning to obtain a purified fiber fraction (and a trash fraction). The raw fiber material, the purified fiber material and the trash fraction were subjected to DNA extraction using the DNeasy®Plant Mini Kit commercialized by QIAGEN according to the manufacturer's recommendations (see DNeasy® Plant Handbook available at www1.qiagen.com/HB/DNeasyPlantMiniMaxi) and the concentrations of the isolated nucleic acids was determined using UV spectrophotometry (Table 1)

Table 1.

Sample	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Pure fiber	3.49	0.07	0.05	1.41	0.52
Pure fiber	4.19	0.084	0.065	1.29	0.51
Raw fiber	14.91	0.298	0.194	1.54	0.43
Raw fiber	17.4	0.348	0.239	1.46	0.43
Trash only	76.55	1.531	1.09	1.4	0.45

[66] The isolated nucleic acids were used as templates in a standard PCR reaction using the following primers to detect an endogenous cotton glucanase gene (GhGluc1;

see EP 08075514.3 herein incorporated by reference for nucleotide sequences of different alleles of GhGluc1):

SE002: ggccgaagccgatcttatctagg (SEQ ID No.: 1)

SE003: cggcaacaatcttccatctccag (SEQ ID No.: 2)

[67] Both 1µl and 5 µl of template nucleic acids were used. The results of the PCR amplification are visualized in Figure 1. A 656 bp amplicon (as expected) is clearly detected using pure fiber (5µl template) (lane 4) whereas a faint signal can be observed using small amount (1µl) of nucleic acids isolated from both pure and raw fiber material. No amplification signal can be detected in the nucleic acids isolated from the trash material only nor from the nucleic acids obtained from unpurified material when used in higher concentrations indicating that the extract obtained from contaminant materials appears to inhibit the further processing of nucleic acids obtained from raw fiber material.

[68] Interestingly, this experiment demonstrates that nucleic acids, which can be further analyzed, can be extracted from mature cotton fiber material. The experiment also indicates that the quality of the isolated nucleic acids – DNA can be further improved by removing the leaf trash and other impurities from the raw harvested and ginned cotton fibers.

B. Isolation of nucleic acids from *Gossypium barbadense* Pima-Y5 fiber material.

[69] 4 year old raw cotton fiber material from *Gossypium barbadense* Pima5Y was treated along with *Gossypium hirsutum* FM966 cotton fiber material, as described above in 1.A. The obtained nucleic acids were used as templates in PCR reactions as described in 1.A. The results are visualized in Figure 2.

[70] Although *Gossypium barbadense* fibers are stronger and have a different architecture from *Gossypium hirsutum* fibers, the results demonstrate that nucleic acids including processable DNA can also be isolated from these fibers. Interestingly, these

fibers had also been stored for several years under non-optimal conditions indicating that processable DNA or other nucleic acids can be obtained from old fiber material.

C. Amplification of other cotton endogenous genes.

[71] The isolated nucleic acids were also used as templates in standard PCR reactions using primers specific for other endogenous genes such as the following primers which amplify a 299 bp fragment from the expansin encoding gene:

KI51: gggagcttggtgttatggaaacc (SEQ ID No.: 5)

KI52: cagggacgatcccagctcgatattc (SEQ ID No.: 6)

The expected amplicons could also be detected using these other primers for other endogenous genes.

D. Isolation of nucleic acids from cotton fiber material using other lysis buffers and protocols.

[72] Raw cotton fiber material was purified as described in section 1.A. by removing the contaminating leaf trash material and other impurities. Nucleic acids were extracted from the purified fiber material using either the DNeasy® Plant Mini Kit commercialized by QIAGEN or the Wizard® Genomic DNA Purification Kit commercialized by PROMEGA CORPORATION or the conventional CTAB procedure (Doyle and Doyle, 1987, Phytochem. Bull. 19, 11). The concentration of the obtained nucleic acids was determined using U.V. spectrophotometry (Table 2).

Table 2.

Sample	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Qiagen 1	7.66	0.153	0.069	2.21	1.4
Qiagen 2	19.97	0.399	0.241	1.66	0.76
Promega 1	21.34	0.427	0.208	2.05	1.42
Promega 2	38.14	0.763	0.389	1.96	1.06
CTAB*	225.22	4.504	2.235	2.02	1.42

* Note: High concentration readings probably due to absence of RNase treatment.

[73] The isolated nucleic acids were used as templates in a standard PCR reaction using the following primers to detect an endogenous cotton glucanase gene (GhGluc1; see EP 08075514.3 herein incorporated by reference for nucleotide sequences of different alleles of GhGluc1):

SE002: ggccgaagccgatcttatctagg (SEQ ID No.: 1)

SE003: cggcaacaatcttccatctccag (SEQ ID No.: 2)

[74] Both 1 µl and 5 µl of template nucleic acids were used. The results of the PCR amplification are visualized in Figure 3. The expected DNA amplicon was observed using template nucleic acids isolated by any method, although apparently higher concentrations of the nucleic acids (5 µl reaction) isolated by Wizard® and CTAB procedures had a negative effect on the PCR reaction.

[75] Albeit with a lower efficiency, we observed that nucleic acids could also be extracted from the cleaned fiber material by incubating this fiber material with water (H₂O) for a certain amount of time (e.g. at least 4 hours incubation of the cleaned fiber material in the presence of a volume of water).

Example 2: Isolation of nucleic acids from textiles.

A. Isolation of nucleic acids from cotton cloth.

[76] The successful isolation of nucleic acids, such as DNA which can be further processed, from mature cotton fibers, spurred an attempt to isolate biological macromolecules such as nucleic acids, particularly processable DNA from fibers after spinning and weaving. To this end, yarns were isolated by unweaving a piece of cotton cloth, cut into smaller pieces and incubated in 5 ml of lysis buffer (DNeasy® AP1 buffer) at 65°C for at least 30 minutes or overnight at room temperature. Buffer was squeezed out of the material and 500 µl lysate was transferred to an eppendorf tube and further treated according to the manufacturer's recommendations i.e.:

- add 130 µl AP2 buffer, mix and incubate on ice for 5 minutes
- centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm

- transfer the liquid phase to the lilac QIAshredder mini spin column
- centrifuge for 2 minutes at 13000 rpm
- transfer the flow through to a new eppendorf tube without disturbing the pellet;
- add 800 μ l AP3/E buffer and mix
- transfer 650 μ l to the DNeasy® mini spin column and centrifuge for 1 minute at 8000 rpm, discarding the flow-through
- repeat this step with the remaining sample; discard the collection tube and place the column in a new 2 ml collection tube
- wash the column with 500 μ l AW buffer and centrifuge for 1 min at 8000 rpm, discard the flow-through
- wash the column with 500 μ l AW buffer and centrifuge for 2 min at 13000 rpm, discard the flow-through
- place the column in a 1.5 ml eppendorf without ethanol carryover.
- Add 50 μ l water to the column and incubate at least 5 minutes at room temperature
- Centrifuge for 1 minute at 8000 rpm. Store the DNA at 4 °C.

[77] 1 and 5 μ l samples were used as template DNA in a PCR reaction using the primers of example 1.A. The results are visualized in Figure 4. When nucleic acid samples after overnight incubation were used, the expected amplicon of 669 bp could be detected, indicating that the protocol can be used to isolate nucleic acids from cotton fibers after spinning and weaving. The significantly stronger PCR signal after overnight incubation versus the 30 minutes incubation, indicates the former protocol results in higher concentration of processable DNA.

B. Isolation of nucleic acids from textiles with different weaves.

[78] The nucleic acid isolation protocol was also applied to finished apparel with different weaves (i.e. which has undergone different processing). To this end, pieces

were cut from a cotton long-sleeve shirt (woven) and a cotton polo (knitted) and threatened as in Example 2A, with the exception that incubation in lysis buffer was performed either overnight, or even prolonged to 6 days of incubation. A PCR reaction as described in Example 2.A was performed on the isolated nucleic acids and the results are visualized in Figure 5.

[79] The expected amplicon was detected after PCR amplification using nucleic acid samples isolated from both kinds of fabrics. Again, the signal was stronger in samples in which the incubation in lysis buffer had been prolonged.

Example 3: Isolation of nucleic acids from specialty fibers.

[80] Mature fibers were isolated and purified from transgenic cotton plants comprising an N-acetylglucosamine transferase chimeric gene ("NodC gene") as described in WO2006/136351 Example 1. Nucleic acids were isolated from the purified fibers extraction using the DNeasy®Plant Mini Kit commercialized by QIAGEN according to the manufacturer's recommendations (see DNeasy® Plant Handbook available at www1.qiagen.com/HB/DNeasyPlantMiniMaxi) and the concentrations of the isolated nucleic acids was determined using UV spectrophotometry (Table 3)

Table 3.

Sample	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
NodC1	7.95	0.159	0.105	1.51	0.56
NodC2	7.62	0.152	0.101	1.51	0.56

[81] The isolated nucleic acids were also used as templates in standard PCR reactions using primers specific for other endogenous genes such as the following primers which amplify a 1224 bp fragment from the NodC encoding gene:

Idb093: cgttttcactcatcgctgtttcaagtgctgtagatgtgatcggtttgcttgcg (SEQ ID No.: 3)

Idb126: ggcgcgccttaggaactctgcgtgatagccac (SEQ ID No.: 4)

[82] Both 1 µl and 5 µl of template nucleic acids were used. The results of the PCR amplification are visualized in Figure 6. The expected DNA amplicon indicative of the presence of the transgene could be observed in each sample.

Example 4: Automation and differentiation between different fiber types.

[83] As described in unpublished EP application 08075514.3 herein incorporated by reference, the glucanase1 A subgenome allele from *Gossypium barbadense* differs from the glucanase 1 subgenome allele from *Gossypium hirsutum* by the presence of a stop codon in the coding region of Gluc1 A subgenome allele in the former. This polymorphism could be used to differentiate between cotton fibers from plants having the *Gossypium barbadense* Gluc1 allele or the *Gossypium hirsutum* Gluc1 allele. To this end, a Taqman® assay was designed, whereby the oligonucleotide primers to amplify a DNA fragment carrying the polymorphism used were:

Forward primer: GCTTTTGGGAAGCGATATAACATCGA (SEQ ID No.: 7)

Reverse primer: GGCATAGGCAAAATAAGGGTACACA (SEQ ID No.: 8)

[84] The polymorphism was detected by the monitoring of the degradation of the following fluorescence marked primers detecting the polymorphism:

VIC- AATCCTGTCGAACCAG (hirsutum allele) (SEQ ID No.: 9)

FAM- ATCCTGTCAAACCAG (barbadense allele) (SEQ ID No.: 10)

[85] These primers were used in a qPCR setup, increasing the numbers of cycles up to 60 and determining fluorescence at the endpoint only. As nucleic acid templates, mixes of DNA isolated from either *G. barbadense* fibers (PIMA) or *G. hirsutum* fibers (FM966) were used in the following ratios: 100% PIMA, 75% PIMA/25%FM966, 50% PIMA/50%FM966, 25% PIMA/75%FM966, 100%FM966. The results are schematically represented in Figure 7.

[86] The X axis indicates the presence of the *G. hirsutum* allele of Gluc1, while the Y-axis indicates the presence of the *G. barbadense* allele of Gluc1. In DNA isolated from PIMA fibers, only the *G. barbadense* allele of Gluc1 was detected. In DNA isolated from FM966 fibers, only the *G. hirsutum* allele of Gluc1 was detected. In the mixed DNA samples, the Taqman analysis allows the detection of the various ratio's of both alleles.

[87] In a further step, the same RT-PCR type analysis was used to analyze nucleic acid samples from cotton textile and fiber material from a FM966 bale. The results are represented in Figure 8. In nucleic acids extracted from the FM966 bale and from the polo shirts, only the *G. hirsutum* allele of Gluc1 was detected, indicating that the cotton material used exclusively originated from *G. hirsutum* type material.

[88] Although the assays may need further optimization, such optimization is clearly within the realm of the skilled person.

Example 5: Characterization of the plastid genome isolated from cotton fibers.

[89] Because of the unexpected finding that genomic DNA can be isolated and characterized from mature cotton fibers we investigated the possibility of identifying plastid DNA in the pool of DNA extracted from these fibers.

[90] Although, leucoplast plastids have been shown to be present in developing cotton fibers (Ryser U. (1985) *European journal of cell biology* 39, pp. 236-256) they are not expected to be present in mature cotton fibers. Leucoplasts are similar to chloroplasts by having the same genome - because they differentiated from the same progenitor cell type - but leucoplasts are specialized with high accumulation of starch content.

[91] Cronn *et al* (2002) *American Journal of Botany* 89(4): 707-725 published primer combinations to amplify 4 genes of the plastid genome (*rpl16*, *matK*, *trnT-trnL* and *ndhF*). In a first step we optimized the published primer combinations for amplification of these four genes by carrying our PCR analysis on DNA isolated from cotton leaves. In a next step, the optimized primer combination per gene was used for amplification on a fiber DNA sample obtained from a cotton mini bale (Certified FiberMax cotton). We surprisingly showed amplification of 4 PCR fragments from this fiber DNA sample. Subcloning in TOPO-blunt vectors followed by sequence analysis of these fragments confirmed that these four fragments originated from the plastid genome. For *rpl16*, *matK*

and trnT-trnL the sequencing resulted in a unique consensus sequence, for ndhF several consensus sequences were obtained.

[92] Since the complete chloroplast sequences of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* are available in the EMBL database (entry DQ345959 is the chloroplast DNA sequence of coker 310 FR (*G. hirsutum*) and entry AP009123 is the chloroplast DNA sequence of *G. barbadense*) it was possible to align the obtained sequences with the published sequences. It was found that the obtained sequences were 100% identical to the published *G. hirsutum* sequences (except for the degenerate primer sites). This confirms that the fiber in the cotton bale was derived from *G. hirsutum*.

The successful molecular characterization of these specific plastid sequences now provides novel opportunities for genotyping of fiber DNA. Also older fiber samples can be probed for plastid sequences and their relationship can be interpreted during evolution and breeding.

[93] PCR conditions:

2µl template

1.5µl forward primer (10µM)

1.5µl reverse primer (10µM)

21µl MQ

1µl dNTP

10µl 10X HF buffer

0.5µl Phusion

12.5µl MQ

PCR program

30s @ 98°C

10s @ 98°C

30s @ 60°C

60s @ 72°C

35 cycles

10min @ 72°C

Hold @ 4°C

[94] Primer combinations :

rpl16	F71: gctatgcttagtgtgtgactcgtt (SEQ ID No 11)
	R1516: cccttcattcttcctctatgttg (SEQ ID No 12)
matK	matKF3: ctaatggatcaacagaawcggttg (SEQ ID No 13)
	trnKR: aactagtcggatggagtag (SEQ ID No 14)
trnT-trnL	trnL2: aatattactgactccmttttkattttckag (SEQ ID No 15)
	trnB: tctaccgatttcgcatatc (SEQ ID No 16)
ndhF	5'Fnew: gaatatgcatggatcatacc (SEQ ID No 17)
	1318R: cgaaacataataaatgergttaatcc (SEQ ID No 18)

Example 6: characterization of the genome of nucleic acids isolated from cotton fibers.

[95] The previous examples have convincingly shown that DNA can be isolated and characterized from mature cotton fibers and from downstream products thereof. In a next step we questioned if the isolated fiber DNA is a true representation of the whole cotton genome or whether it represents only a fraction of the cotton genome. A partial genome equivalent would not be useful for trait or genotype testing as it would generate unreliable and incomplete assay results. The first challenge was to overcome the limited amount of DNA obtained from cotton fibers as starting material for assay testing. The method of Whole Genome Amplification (WGA) was chosen to overcome this limitation. WGA has not been used before to amplify a polyploid genome such as cotton, for genotyping and trait testing. A DNA amplification step is important to enhance the amount of starting fiber DNA material but it is critical not to introduce a genome bias which is sometimes inherent to a WGA step as reported by Giardina *et al* (2009) *BMC Genomics* Apr 14, 10:159. We addressed the reliability of a WGA step on isolated fiber DNA in a functional Taqman assay. Thereto the quality of WGA-amplified fiber DNA

was compared with WGA-amplified cotyledon DNA of the same commercial cotton fiber source in substantially the same Taqman assay.

[96] Approximately 500 grams of FM9063B2F fiber (500 grams samples each in 3 small brown bags; 3 replicates were taken from different bales for the sample variety, Bale no 721134350138, 721134350154, 721134350156) was provided by K. Merritt from a CropMark Direct farm. The fiber was from cotton grown in the 2008-9 cotton season and listed for the FiberMax Certification Program.

[97] Since we had determined that contaminants in fiber can have a significant impact upon the use of fiber DNA for downstream testing we manually cleaned the fibers. This is done by stretching a small amount of fibers (e.g. 1.5 grams) whereby most of the debris is removed with tweezers until no debris can be seen with the naked eye.

DNA extraction was carried out with the Qiagen DNeasy Plant Mini kit with the following steps:

- Take 1 gram of cleaned (no leaf trash) mature cotton fiber and put it in a 50ml Falcon tube. Cut the fibers a few times with clean scissors.
- Add 5ml AP1 lysis buffer (Qiagen cat. 1014630) and 100 μ l RNaseA (10mg/ml). Use a pestle to homogenize the contact between sample and buffer.
- Incubate at 65°C for 20min, use a 15ml tube to mix the material 2 to 3 times during the incubation.
- Use a 15ml tube to squeeze the material in order to transfer 500 μ l lysate into a 2ml eppendorf tube. 3 aliquots are taken and used as duplicates.
- Add 130 μ l AP2 buffer, mix and incubate 5min on ice to each aliquot.
- Centrifuge for 5min at 13000rpm.
- Transfer the liquid phase to the lilac QIAshredder mini spin column.
- Centrifuge for 2min at 13000rpm.
- Transfer the flow-through to a new eppendorf tube without disturbing the pellet.
- Add 800 μ l AP3/E buffer and mix.

- Transfer 650µl to the DNeasy mini spin column and centrifuge for 1 min at 8000rpm, discard the flow-through.
- Repeat this step with the remaining sample. Discard the collection tube and place the column in a new 2ml collection tube.
- Wash the column with 500µl AW buffer and centrifuge for 1 min at 8000 rpm, discard the flow-through.
- Wash the column with 500µl AW buffer and centrifuge for 2 min at 13000 rpm, discard the flow-through and collection tube.
- Place the column in a 1.5ml eppendorf tube without ethanol carryover.
- Add 50µl MQ water to the column and incubate at least 5min at room temperature.
- Centrifuge for 1min at 8000rpm. Store the DNA at 4°C (short term) or -20°C (long term).

[98] Cotyledon DNA extraction of FM9063 B2F was carried out as follows. 50 seeds of FM9063 B2F were germinated with germination paper and water in a 28°C germinator. Cotyledons were collected and dried with silicon. Cotyledon DNA was extracted. Extracted cotyledon DNA was combined into five 1.5ml tube.

[99] Whole Genome Amplification was carried out with the Sigma's GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (WGA2) with the following steps:

- Add 1µl of 10x Fragmentation Buffer to 10µl of extracted DNA in a PCR tube.
- Incubate in a thermal cycler at 95°C for 2 minutes and cool on ice.
- Add 2µl of 1x Library Preparation buffer.
- Add 1µl of Library Stabilization Solution and mix.
- Incubate in a thermal cycler at 95°C for 2 minutes and cool on ice.
- Add 1µl of Library Preparation Enzyme and mix.
- Incubate in thermal cycler using program WGA1
 - 16°C for 20 minutes
 - 24°C for 20 minutes
 - 37°C for 20 minutes

75°C for 5 minutes

4°C forever

- Add the following master mix:

7.5µl 10x Amplification Master Mix

47.5µl nuclease-free water

5µl WGA polymerase

- Incubate in thermal cycler using program WGA2

95°C for 3 minutes

14 cycles of: 94°C for 15 seconds

65°C for 5 minutes

4°C forever

- Put 5µl on a 1% agarose gel to check the quality of the WGA DNA. A smear between 100 and 1000bp should be present.

[100] All the WGA reactions (fiber and cotyledon) proved to be successful.

[101] Optionally the WGA-amplified DNA of cotyledon and fiber of FM9063 B2F was further purified in the following way. Combine WGA DNA from 5 samples into 2ml tube (about 240ul DNA), add 24ul 3M sodium acetate pH5.2 and mix, add 800ul 100% ice cold ethanol and mix thoroughly and overnight at -20°C, centrifuge at -20°C for 10min at 12000rpm, carefully remove supernatant, wash DNA pellet with 800ul 70% ice cold ethanol, centrifuge at -20°C for 2min at 12000rpm, carefully remove supernatant, put tube in 65°C incubator for 15 min to dry, resuspend DNA in 65ul 1x TE buffer.

[102] Two different Taqman assays were carried out on the amplified DNA samples. One Taqman assay aimed at identifying 40 different SNPs and another Taqman assay aimed at identifying 3 different traits: Bollgard II (Mon531), Bollgard (MON15985) and Flex (MON 88913). Each of these Taqman assays were carried out on 4 different samples of DNA: 1) WGA-amplified DNA extracted from FM9063 B2F fiber, 2) WGA-amplified DNA extracted from cotyledon FM9063 B2F, 3) purified WGA-amplified DNA of FM9063 B2F fiber and 4) purified WGA-amplified DNA of FM9063 B2F cotyledon.

Because it is known that the cotton A-subgenome (At) is 50% larger than the cotton D-subgenome (Dt) in physical size, 23 SNPs were selected from the A-genome and 17 were selected from the D-genome.

[103] It was observed that all 40 SNPs could be successfully detected in the Taqman assay in purified FM9063 B2F WGA-amplified fiber DNA. In addition, an identical result for the detection of the same 40 SNPs was obtained with the purified FM9063 B2F cotyledon WGA DNA and with raw (i.e. unpurified) FM9063 B2F cotyledon DNA. The Taqman assay for the detection of Bollgard II (Mon531), Bollgard (MON15985), and Flex (MON 88913) also proved to give identical results between the WGA-amplified DNA samples of fiber and cotyledon. Mon531 was assayed according to Yang *et al* (2005) *J. Agric. Food Chem.* 53, 6222-6229. Mon15985 and Mon88913 were assayed according to Lee *et al* (2007) *J. Agric. Food Chem.* 55, 3351-3357.

[104] Thus, WGA-amplified cotton fiber DNA can be used as a reliable source for successful molecular marker determination since it provided identical results as a Taqman assay carried out on WGA-amplified leaf DNA. In addition, WGA-amplified cotton fiber DNA can be used as a reliable source for successful trait determination since it provided the same results as a Taqman assay carried out on WGA-amplified leaf DNA. Although usually a higher number of SNPs (about 300) should be used for the characterization and identification of a specific cotton variety, the present example shows that this approach is feasible by using WGA-amplified cotton fiber DNA.

Example 7: Other biological macromolecules isolated from cotton fiber material.

[105] UV spectrophotometry of the extracts using the different protocols for the isolation indicate that these extracts do not consist purely of DNA and may contain other biological macromolecules. Using a Bradford analysis, a low concentration of proteins (about 10 ng/ μ l) was found. In addition, the fiber extracts contained various concentrations of small RNAs, resistant to RNase I, which we identified as micro RNAs.

Claims

1. A method for characterizing a mature plant fiber or a processed plant fiber comprising the steps of
 - a. isolating from said plant fiber a biological macromolecule naturally occurring in said plant fiber other than polysaccharides or lignin; and
 - b. characterizing the information encoded in the sequence of the monomers of said biological macromolecule.
2. A method for identifying a mature plant fiber or a processed plant fiber comprising the steps of
 - a. isolating from said plant fiber a biological macromolecule naturally occurring in said plant fiber other than polysaccharides or lignin; and
 - b. subjecting said biological macromolecule to a detection assay specific for said plant fiber.
3. The method of claim 2, wherein said plant fiber is a seed fiber.
4. The method of claim 2, wherein said plant fiber is a cotton fiber.
5. The method of any one of claims 2 to 4, wherein said biological macromolecule is selected from the group of polypeptides, proteins, nucleic acids, DNA, RNA, single stranded RNA and double-stranded RNA.
6. The method of any one of claims 2 to 5, wherein said detection assay is a polymerase chain reaction based detection assay.
7. The method of any one of claims 2 to 5, wherein said detection assay is an antibody based detection assay.

8. The method of any one of claims 2 to 5, wherein said detection assay is a nucleic acid hybridization based detection assay.
9. The method of any one of claims 2 to 8, wherein said detection assay detects the presence or absence of chimeric genes present in the genome of the plant producing the fibers.
10. The method of claim 9, wherein said chimeric gene comprises a coding region or part or an antisense portion thereof selected from N-acetylglucosamine transferase, phosphotricinacetyltransferase, EPSPS, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, an insecticidal portion of *Bacillus thuringiensis* crystal protein, poly(ADP-ribose) polymerase, poly(ADP-ribose) glucosyltransferase, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase, glucanase, cellulose synthase, chitinase, expansin, callose synthase, kinase, nicotinamidase, nicotinate phosphoribosyltransferase, nicotinic acid mononucleotide adenylyl transferase, nicotinamide adenine dinucleotide synthetase or nicotine amide phosphorybosyltransferase.
11. The method of claim 9, wherein said detection assay is an event-specific detection assay.
12. The method of any one of claims 2 to 8, wherein said detection assay detects the presence or absence of specific alleles present in the genome of the plant producing the fibers.
13. The method of any one of claims 2 to 12, wherein said fiber is present in yarns, fabric, tissue or finished apparel.
14. A method for analyzing the genome of a fiber producing plant comprising the steps of
 - a. Isolating nucleic acids from mature or processed fibers of said plant, said nucleic acids being naturally occurring in said plant fiber; and

- b. subjecting said nucleic acid to a genome analysis protocol.
15. The method according to claim 14, wherein said nucleic acid is selected from the group of DNA, RNA, single stranded RNA and double-stranded RNA.
16. The method according to claim 14, wherein said nucleic acid is DNA.
17. The method according to claim 16, wherein said isolated DNA is subjected to a whole genome amplification step prior to subjecting said nucleic acid to a genome analysis protocol.
18. The method according to any one of claims 14 to 17, wherein said method is applied to old mature fibers, or old yarns, fabrics or finished apparel.
19. A method for isolating nucleic acid from mature plant fibers or processed plant fibers comprising the steps of
- a. removing leaf and stem trash material from the harvested mature plant fibers; and
 - b. incubating said plant fibers in a lysis buffer containing detergents, proteases and salts for a prolonged time, preferably for a period of 4 to 100 hours; and
 - c. processing said lysis buffer according to standard nucleic acid isolation methods and isolating said DNA.
20. The method according to claim 19, wherein said nucleic acid is DNA.
21. A method for isolating a nucleic acid from woven or knitted fabric comprising the steps of
- a. unweaving the threads of said fabric;

- b. incubating said threads in a lysis buffer containing detergents, proteases and salts for a prolonged time, preferably for a period of 4 to 100 hours; and
 - c. processing said lysis buffer according to standard nucleic acid isolation methods and isolating said nucleic acid.
- 22. The method according to claim 21, wherein said nucleic acid is DNA.
- 23. Use of a method according to any one of claims 1 to 18 in a process to certify the identity of traded plant fibers.
- 24. A method to determine the relative amounts of different plant fibers in a mixture of mature or processed plant fibers comprising the steps of
 - a. isolating from said mixture of plant fibers a biological macromolecule naturally occurring in said plant fibers other than polysaccharides or lignin;
 - b. subjecting said biological macromolecule to detection assays specific for each of said plant fibers; and
 - c. determining the relative amount of each of the fibers.
- 25. A method to certify the identity of traded cotton fibers, said method comprising:
 - a. recording purchase of certified cotton seeds by registered growers, said cotton seed comprising a specific genome composition and producing a particular brand of cotton fibers;
 - b. registering bales of raw cotton fibers produced by said registered growers from said certified cotton seed as said particular brand of cotton fibers;
 - c. authenticating said bales by cross checking with said seed purchase records;
 - d. providing said registered bales to mills to produce yarns, fabrics or apparel from said brand of cotton fibers, preferably predominantly, particularly exclusively from said brand of cotton fibers;

- e. auditing the identity of said brand of cotton fibers at one or more steps using a method according to any one of claims 1 to 18.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

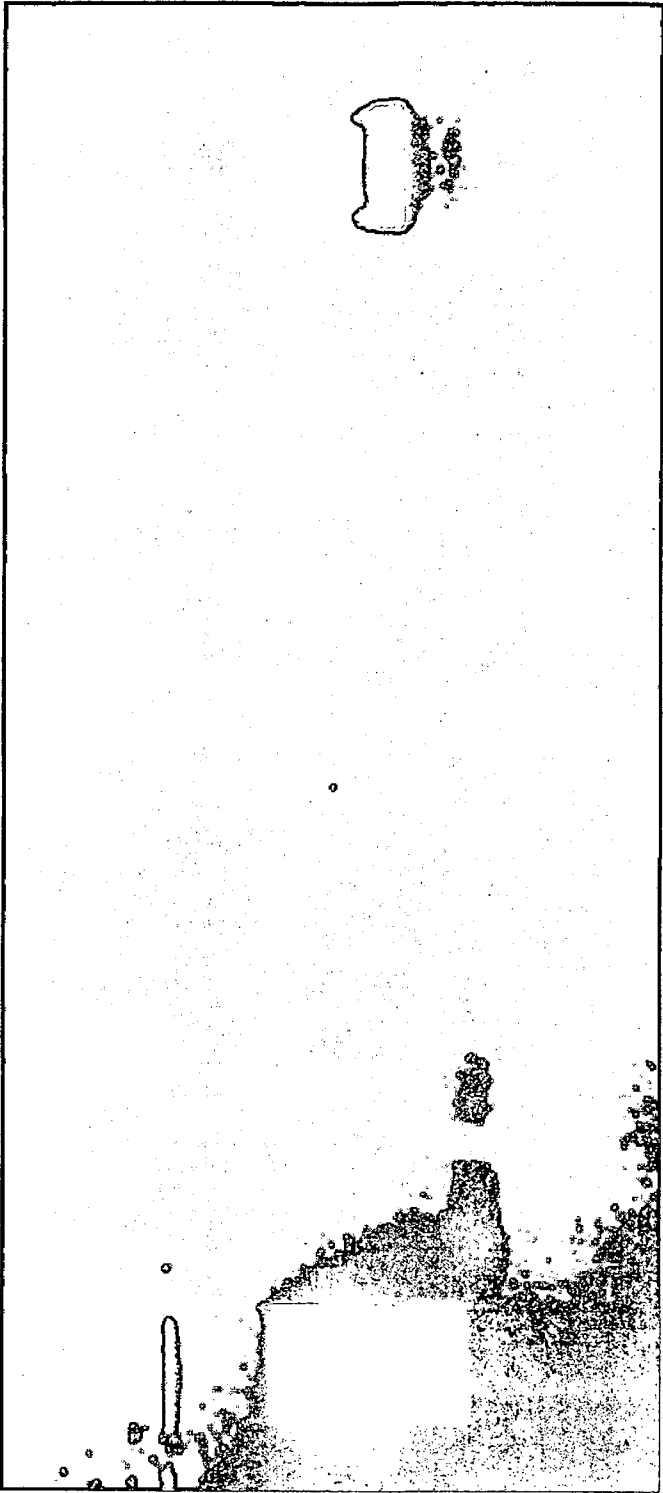


Figure 1

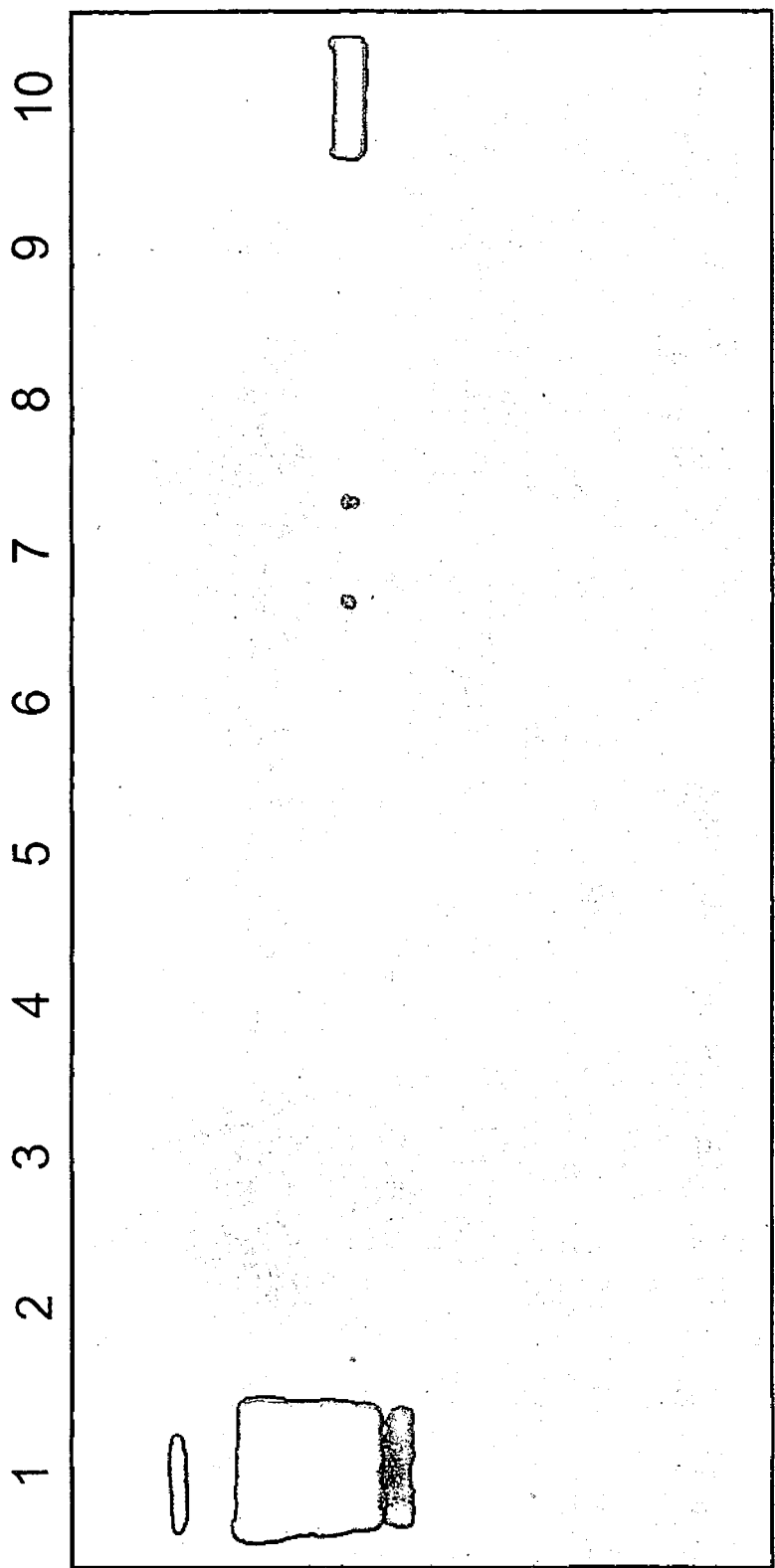


Figure 2

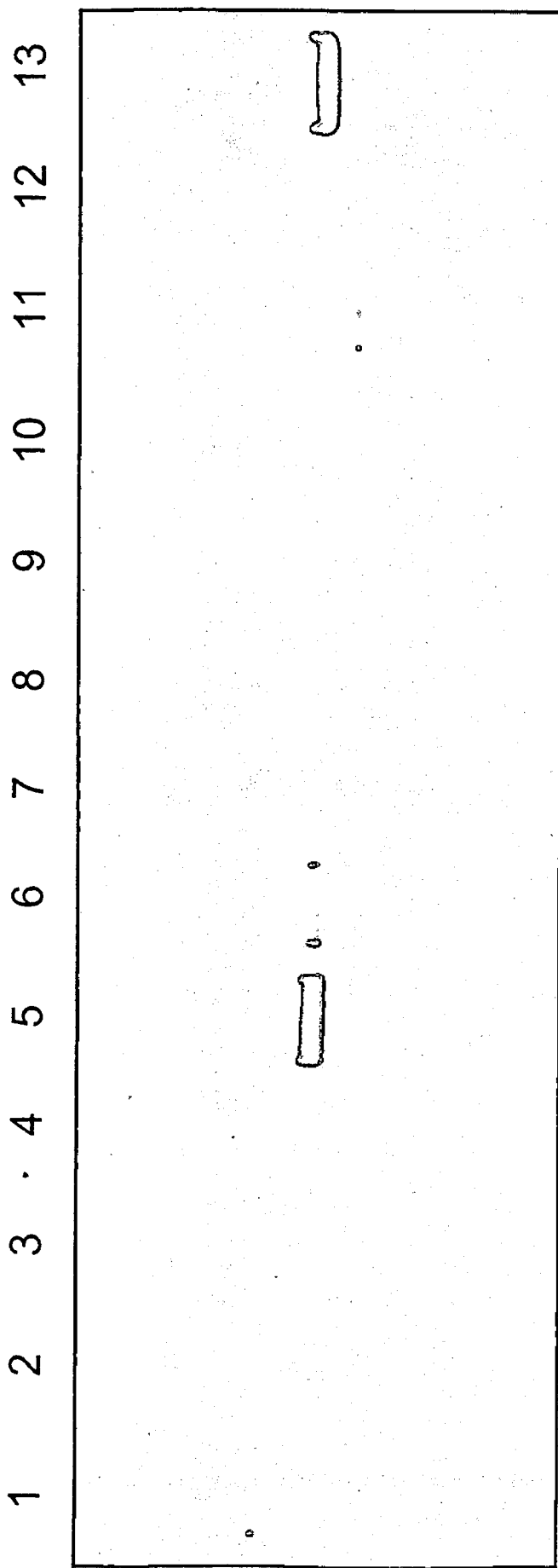


Figure 3

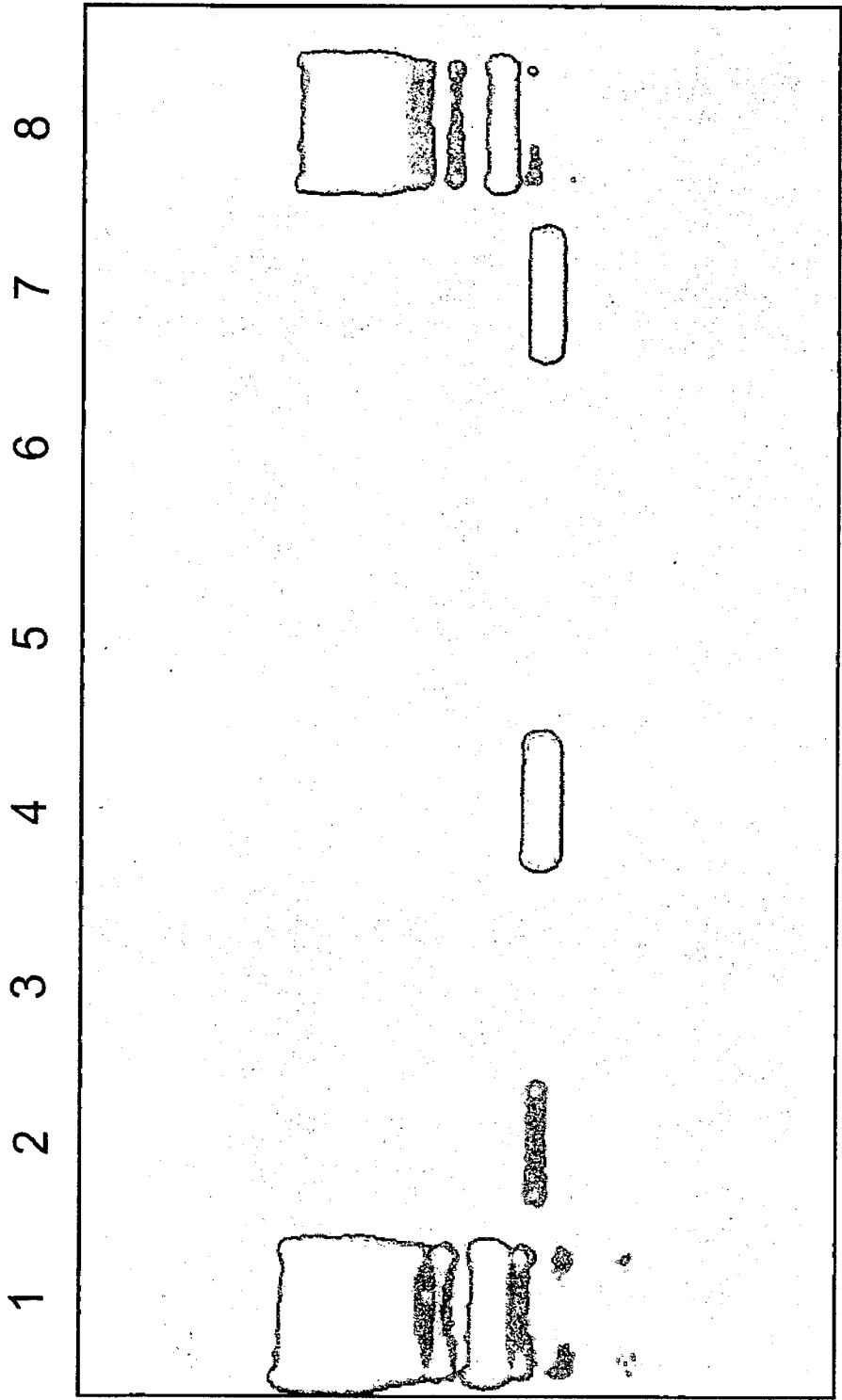


Figure 4

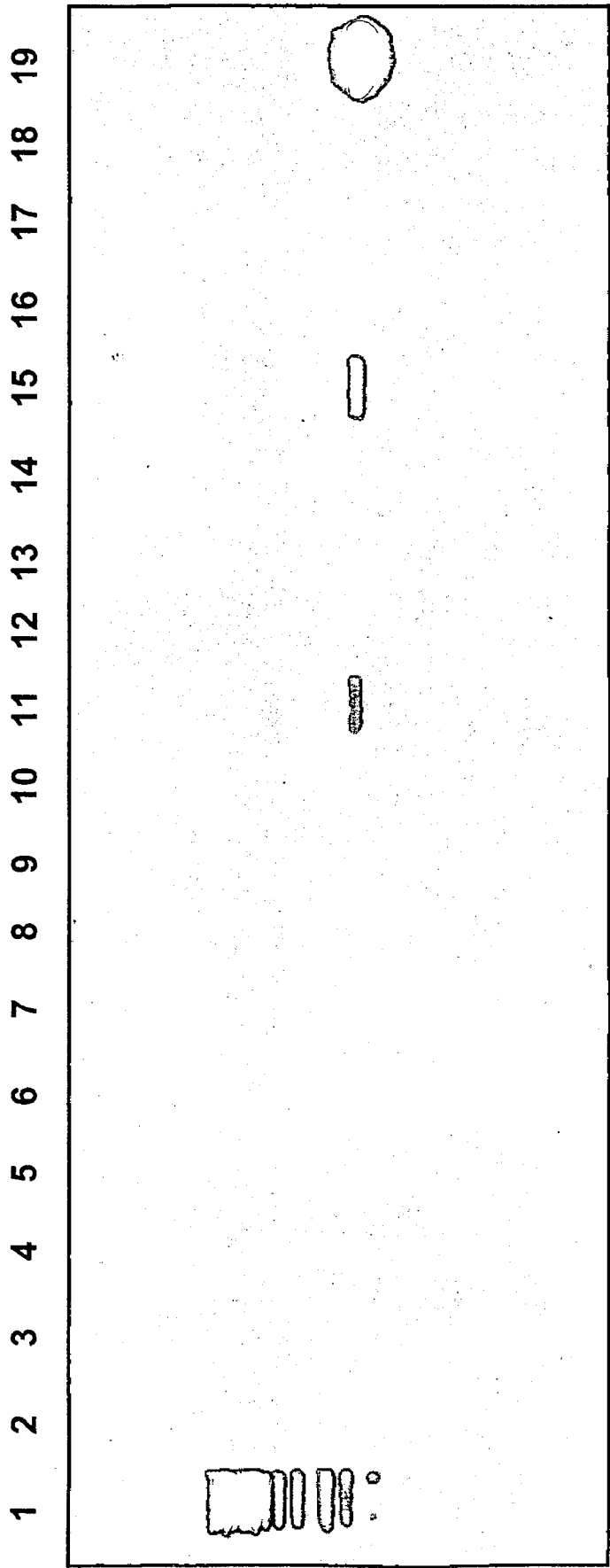


Figure 5

1 2 3 4 5 6 7

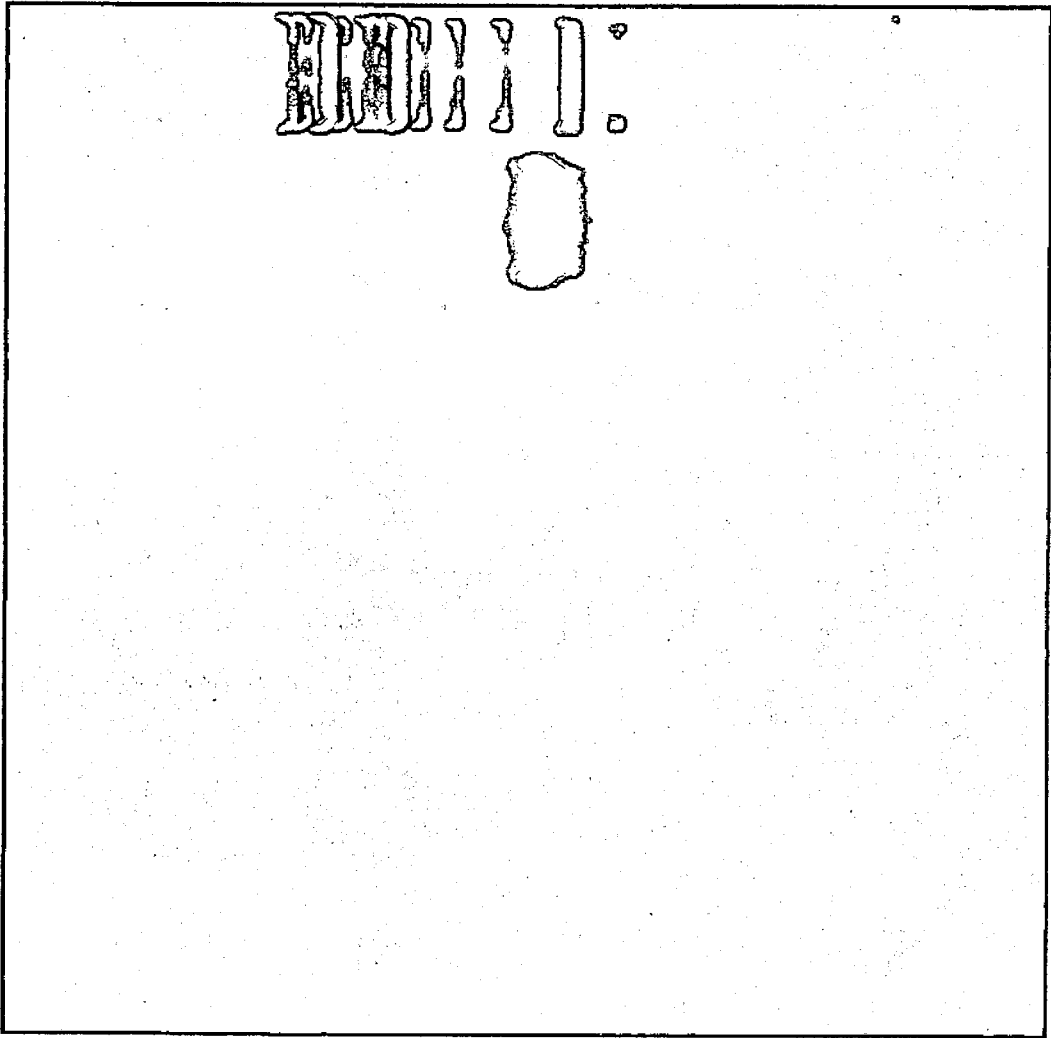


Figure 6

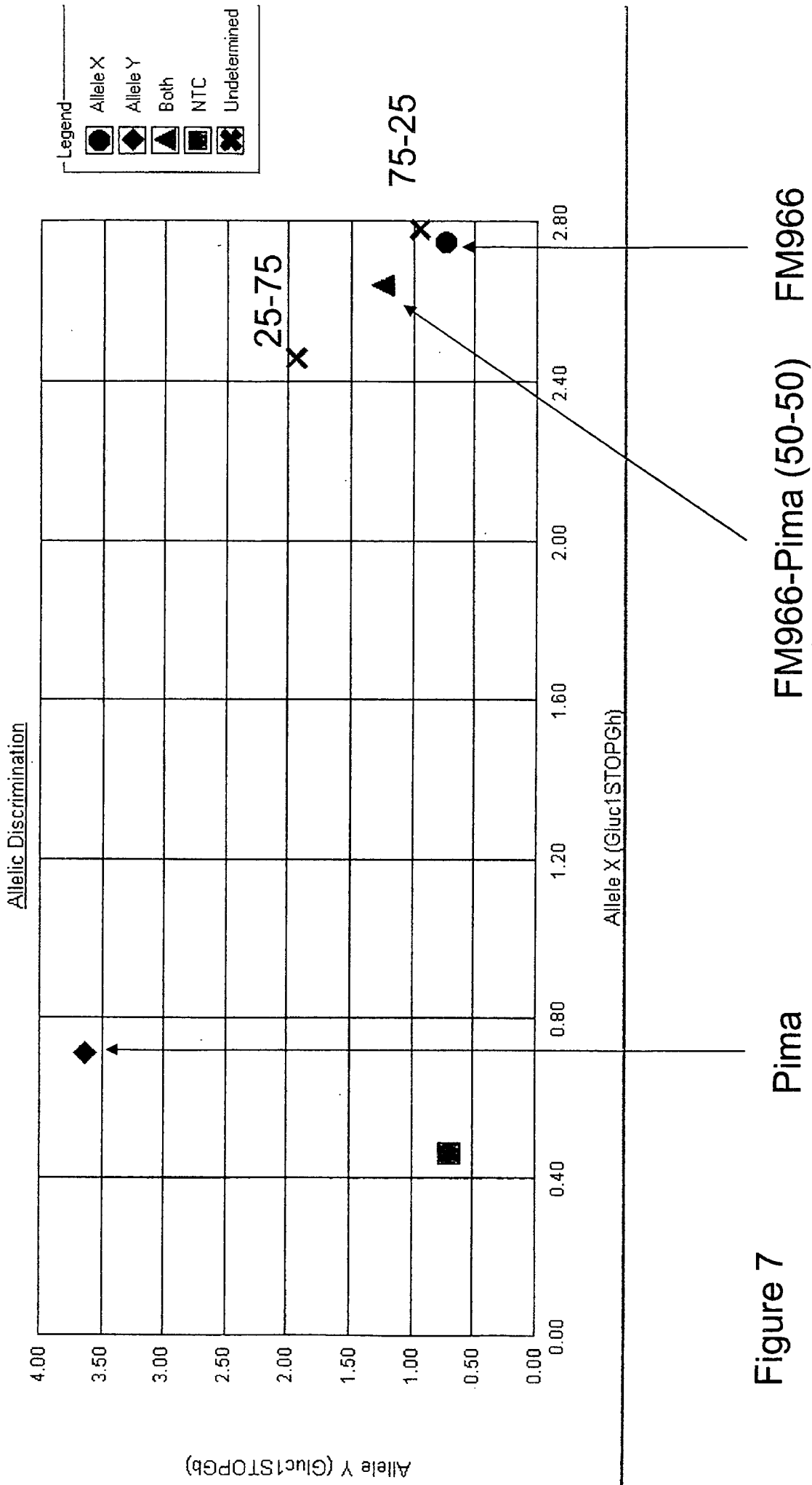


Figure 7

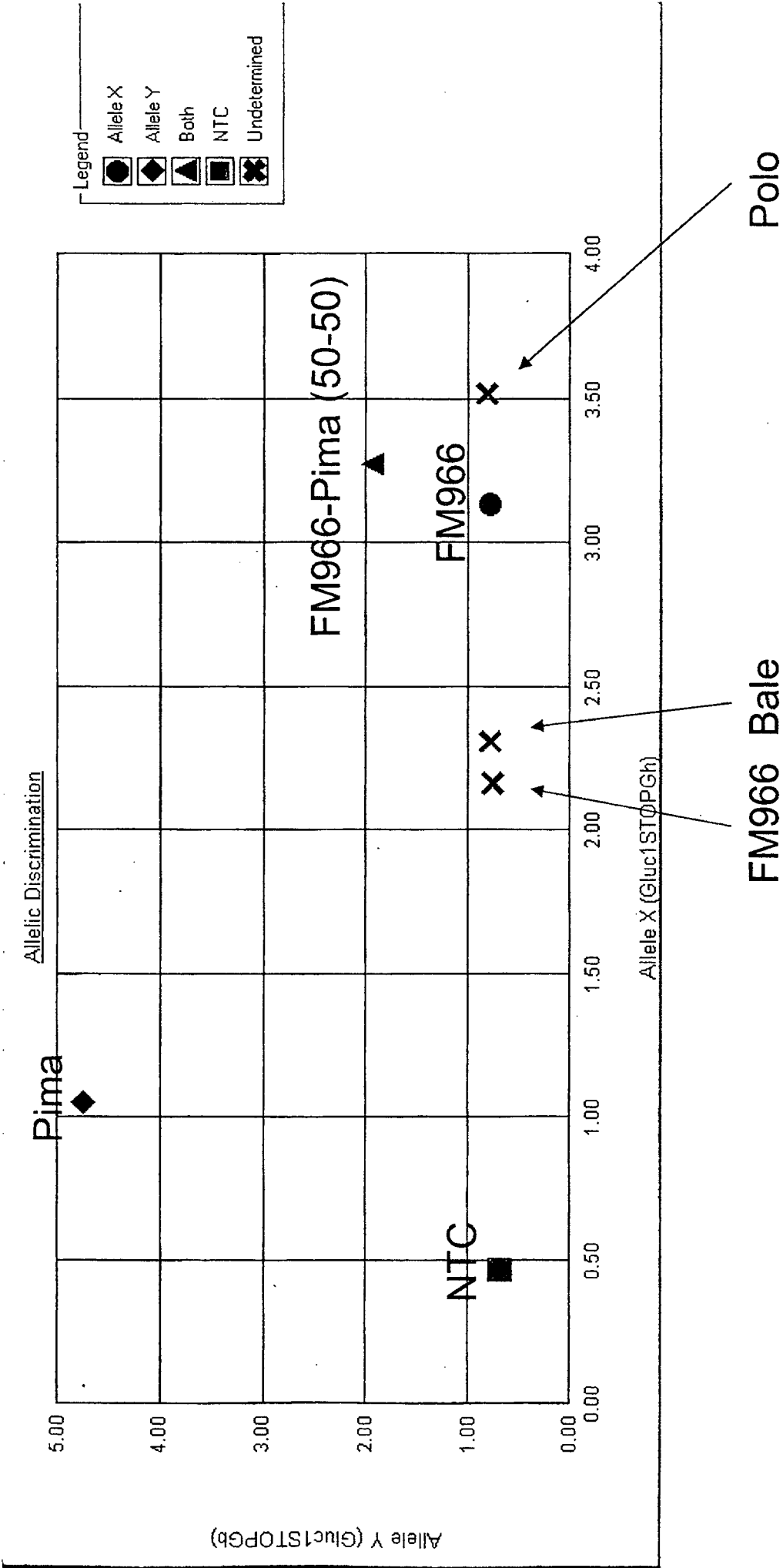


Figure 8

MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FIBRAS**VEGETALES****CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención se refiere a métodos para aislar macromoléculas biológicas que incluyen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, de fibras vegetales maduras tales como fibras de algodón. Las fibras vegetales pueden haber sido procesadas en hilos, los cuales a su vez pueden ser tejidos o

10 tricotados hasta tela o indumentaria acabada, antes del aislamiento de las macromoléculas biológicas. Puesto que las macromoléculas aisladas contienen información codificada en la secuencia de sus bloques estructurales, estas macromoléculas aisladas de fibras vegetales de conformidad con los métodos actualmente descritos, pueden usarse convenientemente para caracterizar la fibra

15 vegetal o identificar el origen o la fuente de la fibra vegetal. La información resultante puede usarse, por ejemplo, en programas de preservación de identidad para fibras vegetales especiales, certificación del origen de las fibras vegetales, o incluso en la reconstrucción del mejoramiento genético de pedigrees usando fuentes históricas de las fibras vegetales.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las fibras vegetales forman una fuente para productos económicamente importantes, tales como papel, cuerdas (cordones y cuerdas) y

25 textiles. Una fibra se define botánicamente como una célula cónica estrecha larga,

muerta y hueca en la madurez, con una pared celular gruesa rígida compuesta principalmente de celulosa y usualmente lignina. Las fibras blandas o liberianas se encuentran en el floema (corteza interior) de los tallos de las dicotiledóneas (lino, yute, cáñamo, ramio). Las fibras duras de hojas o foliares se encuentran en los
5 haces vasculares de las hojas de las monocotiledóneas (sisal, cáñamo de Manila, piña). Las fibras de superficie se desarrollan de la superficie de semillas (algodón), hojas o frutos (fibra de coco).

El algodón provee gran parte de la fibra de alta calidad para la industria textil, y se han invertido esfuerzos importantes en la obtención de fibras
10 de algodón con características que favorezcan los requerimientos de la industria, a través de mejoramiento genético por métodos clásicos o alterando genéticamente el genoma de las plantas de algodón.

La fibra de algodón se origina como un tricoma de la semilla, más específicamente una células individual que se inicia de la epidermis del
15 integumento exterior de los óvulos, en o poco antes de la antesis. El desarrollo morfológico de las fibras de algodón ha sido bien documentado (Basra y Malik, 1984, Int Rev of Cytology 89: 65–113; Graves y Stewart, 1988, citado anteriormente; Ramsey y Berlin, 1976, American Journal of Botany 63 (6): 868–876; Ruan y Chourey, 1998, Plant Physiology 118: 399–406; Ruan *et al.* 2000,
20 Aust. J. Plant Physiol. 27: 795–800; Stewart, 1975, Am. J. Bot. 62, 723–730). Las fibras de algodón, en particular de *Gossypium hirsutum*, sufren cuatro etapas de desarrollo traslapantes: inicio de la célula de la fibra, alargamiento, biosíntesis de la pared celular secundaria y maduración. El inicio de la célula de la fibra es un proceso rápido. Fibras blancas cubiertas de pelusa comienzan a desarrollarse
25 inmediatamente después de la antesis y continúan hasta aproximadamente 3 días

post-antesis (DPA), lo cual va seguido por alargamiento de la célula de la fibra (hasta aproximadamente 10 a aproximadamente 17 DPA). Dependiendo de las condiciones de crecimiento, la biosíntesis de la pared celular secundaria se inicia y continúa hasta aproximadamente 25 a aproximadamente 40 DPA, seguida de un

5 proceso de maduración hasta aproximadamente 45 a aproximadamente 60 DPA. La síntesis de la pared celular secundaria y la fase de maduración se consideran comúnmente como la “fase de aumento de resistencia de la fibra”. Sólo aproximadamente 25 a 30% de las células de la epidermis se diferencian en las fibras de pelusa comercialmente importantes (Kim y Triplett, 2001). La mayoría de

10 las células no se diferencia en fibras, o se desarrolla en fibras cortas o tamo. Durante el alargamiento de la fibra y el metabolismo de la pared secundaria, las células de las fibras se alargan rápidamente, sintetizan los componentes de la pared secundaria, y muestran cambios celulares, moleculares y fisiológicos dramáticos. El alargamiento de la fibra se acopla con el rápido crecimiento y

15 expansión de la célula (Seagull, 1991, en *Biosynthesis and biodegradation of cellulose* (Haigler, C. H. & Weimer, P. J., eds.) pp. 143-2163, Marcel Dekker, New York) y la síntesis constante de una gran cantidad de metabolitos de la célula y componentes de la pared celular tales como la celulosa. Aproximadamente 95% del peso seco en las fibras de algodón maduras, es celulosa (Pfluger y Zambryski,

20 2001, Curr Biol 11: R436–R439; Ruan *et al.*, 2001, Plant Cell 13: 47–63). Los componentes no celulósicos son también importantes para el desarrollo de la célula de la fibra (Hayashi y Delmer, 1988, Carbohydr. Res. 181: 273-277; Huwyler *et al.*, 1979, Planta 146: 635–642; Meinert y Delmer, 1977, Plant Physiol 59: 1088-1097; Peng *et al.*, 2002, Science 295: 147–150). En comparación con otras células

25 vegetales, las fibras de algodón no contienen lignina en las paredes secundarias,

pero tienen grandes vacuolas que presumiblemente están relacionadas con el rápido crecimiento y expansión de la célula (Basra y Malik, 1984, citado anteriormente; Kim y Triplett, 2001, *Plant Physiology* 127: 1361–1366; Mauney, 1984, citado anteriormente; Ruan y Chourey, 1998, citado anteriormente; Ruan *et al.*, 2000, citado anteriormente; Van't Hof, 1999, *American Journal of Botany* 86: 776–779).

Las células de las fibras de algodón en desarrollo son células vivas y, por consiguiente, contienen macromoléculas biológicas tales como péptidos, proteínas, y ácidos nucleicos tales como ADN y ARN. En contraste, las fibras maduras son células huecas muertas, consistiendo principalmente de celulosa. Se acepta generalmente que las células de las fibras, en particular las células de las fibras de algodón, no contienen más ácidos nucleicos o proteínas extraíbles. Con base en esta inercia, se usan hisopos de algodón como un aplicador para sustancias médicas, así como para tomar muestras de ADN de, más comúnmente, la mejilla interior en investigaciones forenses.

Además, las fibras vegetales están sujetas a procesamiento extensivo antes de su uso en la industria, en particular antes de su uso en la industria textil. En el caso del algodón, el procesamiento de la fibra en bruto en el campo hasta la indumentaria acabada para venta, implica numerosos pasos que varían ampliamente, dependiendo del producto final deseado. Los varios pasos posibles en estos procedimientos pueden dividirse generalmente en pasos mecánicos y químicos.

El procedimiento de la cosecha y el desmotado del algodón, puede someter a la fibra a daño térmico y mecánico. No se aplican químicos durante el procedimiento de desmotado. Se usa con frecuencia calor para secar el algodón

durante el procedimiento de desmotado, si contiene más de 8% de humedad. El calor es usualmente regulado estrechamente para evitar el daño de las fibras. Puede ocurrir daño mecánico durante las operaciones de cosecha y desmotado. Este daño mecánico debe afectar un por ciento muy bajo del total de las fibras.

5 Durante la hilatura, los pasos del procedimiento son principalmente mecánicos. Fibras cortas (fibras inmaduras y/o mecánicamente dañadas y material extraño) se remueven en el procedimiento de hilatura. Los primeros tratamientos químicos en el procesamiento se hacen hacia el final del procedimiento de hilatura, cuando el hilo para tricotado se trata con un lubricante y casi la mitad del
10 hilo para tejeduría se trata con material de encolado. El hilo de algodón para tricotado se trata con más frecuencia con cera como un lubricante para facilitar el movimiento del hilo a través del equipo de tricotado. Lubricantes sintéticos están también disponibles, pero se cree que la cera es aún el tratamiento más común. El encolado, denominado también encolaje, se aplica al hilo para tejeduría que se
15 usará como las hebras a lo largo en la tela acabada (la urdimbre). El hilo lateral (guata) no se trata con encolado. El material común usado para el encolado es el almidón. Se usa también alcohol polivinílico para el encolado, y mezclas de almidón y alcohol polivinílico son comunes. Aditivos tales como aglutinantes, humectantes, suavizantes, agentes mojantes, desespumantes y otros adyuvantes,
20 pueden añadirse al tratamiento de encolado.

 El tricotado y la tejeduría son procedimientos mecánicos que no implican aplicaciones de compuestos químicos o calor. Al final de los procedimientos de tricotado y tejeduría, los pasos para preparar la tela restante para acabado implican la aplicación de compuestos químicos y, en algunos casos,
25 altas temperaturas. El objetivo del procedimiento de preparación del paso de

acabado, es remover las impurezas que interferirán con el procesamiento a través del teñido, estampado u otros pasos de acabado. Principalmente, la cera debe ser removida de la tela tricotada (lavado a fondo), y debe removerse el encolado de la tela tejida (desencolado). Otras impurezas que pueden removerse en este paso

5 incluyen hollejos de semillas, pectinas y otros compuestos químicos. Los compuestos químicos usados para el desencolado incluyen enzimas para remover almidón y sosa, ceniza o detergentes para remover alcohol polivinílico. El lavado a fondo se hace con solventes orgánicos que disolverán la cera u otros lubricantes usados. Después del lavado a fondo o el desencolado, la tela se blanquea

10 usualmente usando blanqueador de peróxido o cloro. Los propósitos del blanqueo son remover cualquier material no fibroso restante, hidrólisis, oxidación y remoción del encolado residual, y mejorar la absorbancia del colorante. El blanqueo con peróxido puede implicar vapor o baño de agua a casi las temperaturas de ebullición del agua, y el baño de blanqueador puede contener aditivos tales como

15 estabilizadores y agentes secuestrantes. El blanqueo con cloro se hace a temperaturas más bajas (40 a 50°C), y la degradación de la celulosa es menor que con peróxido. Si se usa cloro para el blanqueo, se requiere también un tratamiento anticloro. El chamuscado con una llama controlada se lleva a cabo en algunas telas para limpiar la superficie de la tela y remover o reducir el frisado. Pueden

20 añadirse abrillantadores ópticos a las telas o prendas que se van a vender como productos no teñidos blancos. Abrillantadores ópticos orgánicos aniónicos se usan típicamente en el algodón. Varios compuestos están disponibles, y algunos pueden añadirse durante el blanqueo.

La mercerización es un procedimiento que puede aplicarse a hilo o

25 tela de algodón para mejorar la absorción del colorante (o la reacción al mismo) y

otros tratamientos de acabado químicos, así como para mejorar la resistencia a la rotura, mejorar la estabilidad dimensional, mejorar la tersura y lustre de la tela, y cubrir fibras de algodón inmaduras. Es un procedimiento que implica tratamiento con NaOH, lavado, lavado a fondo con ácido, enjuague y secado.

- 5 El tratamiento de acabado más común es el teñido. Puede hacerse en la etapa de hilo, tela o prenda. Los colorantes usados para el algodón son numerosos y de muchos tipos diferentes. El producto colorante más común para el algodón es el índigo, pero representa sólo 4% de la tela teñida. El teñido puede hacerse como un procedimiento continuo o un procedimiento intermitente.
- 10 Mientras que los compuestos químicos usados para el teñido son numerosos, el procedimiento implica habitualmente el uso de alta temperatura, cerca de la ebullición, en la cuba de colorante para lo cual la tela, el hilo o las prendas pueden ser sumergidos por tiempo extendido. El estampado es el otro procedimiento importante para la adición de color o diseño a textiles. El estampado implica
- 15 principalmente un procedimiento mecánico para aplicar tintes colorantes a la superficie de la tela o prendas. Tanto el teñido como el estampado pueden implicar la aplicación de agentes fijadores químicos al final del procedimiento.

- Otro tratamiento de acabado común, especialmente después del teñido, es el lavado agresivo. Éste incluiría el uso de detergentes y otros agentes
- 20 de limpieza para remover los materiales de acabado residuales de la tela o prenda acabada.

Muchos otros pasos de acabado químico y mecánico pueden aplicarse a la tela, hilo o prendas, implicando numerosas opciones de procedimientos de tratamiento y químicos. Los suavizantes solos pueden ser de

tres tipos diferentes, y cada tipo puede implicar varios compuestos químicos diferentes.

Aunque el resumen anterior de la conversión de la fibra de algodón en bruto en productos textiles de uso final es altamente generalizado, quedará
5 claro que el experto en la técnica no esperaría poder extraer péptidos, proteínas o ácidos nucleicos de hilos, textiles o productos de indumentaria acabados después de los numerosos pasos de tratamiento térmico y químico implicados habitualmente.

Existe la necesidad en la industria de poder investigar la fuente y/o el
10 origen de las fibras vegetales, en particular de fibras vegetales maduras y/o procesadas. Dicha identificación de la fuente y/o el origen de las fibras vegetales puede ser importante para los procedimientos de certificación, garantizando la producción y el procesamiento de fibras de calidad especificada producidas de germoplasma específico, tal como el programa de certificación FiberMax®
15 (www.certifiedfibermax.com). La capacidad para investigar la fuente y/o el origen de las fibras maduras y/o procesadas, permite también la identificación de fibras vegetales que tienen características especiales, tales como las fibras con reactividad química o afinidad por colorantes mejorada, como se describe en el documento WO2006/136351.

20 Los programas de certificación existentes se basan en el registro por agricultores o comerciantes al por menor de semillas, de la compra de semillas de germoplasma específico de un cultivo de fibras, tales como el algodón, y la identificación de las fibras producidas de los agricultores registrados (en el caso del algodón, por números de identificación de balas permanentes de la USDA).

La capacidad para investigar la fuente y/o el origen de las fibras vegetales, en particular de fibras maduras y/o procesadas, sería ampliamente mejorada si fuese posible extraer macromoléculas biológicas de las fibras vegetales maduras y/o procesadas que contienen información biológica
5 relacionada con la planta fuente de las fibras, tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, ADN o ARN. De esta manera, se haría posible la auditoría de programas de certificación existentes. Además, llegaría a ser posible identificar fibras en una etapa posterior en la cadena de suministro, más allá de los agricultores o proveedores de fibras tal como, por ejemplo, al nivel de hilandera,
10 tejedora o cliente minorista.

Las instituciones Agricultural Research Service, USDA y Applied DNA Sciences, trabajaron juntas para desarrollar un sistema de marcación basado en tecnologías basadas en el ADN, para investigar los componentes textiles y del algodón originados de los Estados Unidos
15 (<http://seedquest.com/News/releases/2004/February/7829.htm>).

De esta manera, sería ventajoso poder extraer macromoléculas biológicas de ocurrencia natural de fibras vegetales, tales como las fibras de algodón, en particular de fibras maduras y/o procesadas, textiles, hilos o indumentaria, y además poder derivar información relacionada con la fuente de la
20 planta de dichas fibras vegetales.

Los métodos descritos más adelante en las diferentes modalidades, ejemplos, figuras y reivindicaciones proveen una solución al problema mencionado anteriormente, permitiendo extraer macromoléculas biológicas naturales de fibras vegetales, tales como las fibras de algodón, en particular de fibras maduras y/o

procesadas, textiles, hilos o indumentaria, y además permiten derivar información relacionada con la fuente de la planta de dichas fibras vegetales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

En una modalidad, la invención provee un método para caracterizar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, tal como una fibra de una semilla o fibra de algodón, que comprende los pasos de aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal
10 diferente de polisacáridos o lignina; y caracterizar la información codificada en la secuencia de los monómeros de dicha macromolécula biológica.

En otra modalidad de la invención, la invención provee un método para identificar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, tal como una fibra de una semilla o fibra de algodón, que comprende los pasos de aislar de
15 dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal diferente de polisacáridos o lignina; y someter dicha macromolécula biológica a una prueba de detección específica para dicha fibra vegetal.

En una modalidad, la macromolécula biológica puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico, ADN, ARN, ARN de cadena sencilla o ARN
20 de doble cadena.

En otra modalidad, la prueba de detección puede ser una prueba de detección basada en reacción en cadena de polimerasa, una prueba de detección basada en anticuerpos, o una prueba de detección basada en hibridación de ácidos nucleicos.

En otra modalidad, la prueba de detección puede detectar la presencia o ausencia de genes quiméricos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras. El gen quimérico puede comprender una región codificante o parte de una porción antisentido de la misma seleccionada de N-
5 acetilglucosamina transferasa, fosfinotricinacetiltransferasa, EPSPS, hidroxifenilpiruvatodioxigenasa, una porción insecticida de proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis*, poli(ADP-ribosa) polimerasa, poli(ADP-ribosa) glucohidrolasa, sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, glucanasa, celulosa sintasa, quitinasa, expansina, calosa sintasa, cinasa, nicotinamidasas, nicotinato
10 fosforribosiltransferasa, ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa, nicotinamida adenín dinucleótido sintetasa o nicotinamida fosforribosiltransferasa. La prueba de detección puede ser también una prueba de detección específica de evento.

En otra modalidad de la invención, la prueba de detección puede
15 detectar la presencia o ausencia de alelos específicos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras.

En otra modalidad de la invención, la fibra de la cual la macromolécula biológica se aísla está presente en hilos, tela, tela con hilos metálicos o indumentaria acabada.

20 La invención provee además un método para analizar el genoma de una planta que produce fibras, que comprende los pasos de aislar ácidos nucleicos de fibras maduras o procesadas de dicha planta, dichos ácidos nucleicos siendo de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal; y someter dicho ácido nucleico a un protocolo de análisis del genoma. El método puede aplicarse a
25 fibras maduras añejas, o hilos añejos, telas o indumentaria acabada.

Otra modalidad de la invención es un método para aislar un ácido nucleico tal como ADN de fibras vegetales maduras o fibras vegetales procesadas, que comprende los pasos de incubar dichas fibras vegetales en un regulador de pH que contenga detergentes, proteasas y sales por un tiempo prolongado, de preferencia por un período de 4 a 100 horas; y procesar dicho regulador de pH de lisis de acuerdo con métodos estándar de aislamiento de ácidos nucleicos, y aislar dicho ADN.

En otra modalidad de la invención, se provee un método para aislar un ácido nucleico, tal como ADN, de tela tejida o tricotada, que comprende los pasos de destejer los hilos de dicha tela; incubar dichos hilos en un regulador de pH que contenga detergentes, proteasas y sales por un tiempo prolongado, de preferencia por un período de 4 a 100 horas; y procesar dicho regulador de pH de lisis de acuerdo con métodos estándar de aislamiento de ácidos nucleicos, y aislar dicho ácido nucleico.

En otra modalidad de la invención, se provee un método para aislar un ácido nucleico, tal como ADN, de fibras vegetales maduras cosechadas, que comprende los pasos de remover material de desperdicio de la hoja y el tallo de las fibras vegetales maduras cosechadas; incubar dichas fibras vegetales en un regulador de pH que contenga detergentes, proteasas y sales por un tiempo prolongado, de preferencia por un período de 4 a 100 horas; y procesar dicho regulador de pH de lisis de acuerdo con métodos estándar de aislamiento de ácidos nucleicos, y aislar dicho ácido nucleico.

La invención provee también el uso de un método de conformidad con la invención, en un procedimiento para certificar la identidad de fibras vegetales comercializadas.

La invención provee además un método para determinar las cantidades relativas de diferentes fibras vegetales en una mezcla de fibras vegetales maduras o procesadas, que comprende los pasos de aislar de dicha mezcla de fibras vegetales, una macromolécula biológica de ocurrencia natural en
5 dichas fibras vegetales diferente de polisacáridos o lignina; someter dicha macromolécula biológica a pruebas de detección específicas para cada una de dichas fibras vegetales; y determinar la cantidad relativa de cada una de las fibras.

En otra modalidad de la invención, se provee un método para certificar la identidad de fibras de algodón comercializadas, dicho método
10 comprendiendo registrar la compra de semillas de algodón certificadas por agricultores registrados, dicha semilla de algodón comprendiendo una composición específica del genoma y produciendo una marca particular de fibras de algodón; registrar balas de fibras de algodón en bruto producidas por dichos agricultores registrados de dichas semillas de algodón certificadas como dicha
15 marca particular de fibras de algodón; autenticar dichas balas por verificación cruzada con dichos registros de compra de la semilla; proveer dichas balas registradas a molinos para producir hilos, telas o indumentaria de dicha marca de fibras de algodón, de preferencia predominantemente, en particular exclusivamente de dicha marca de fibras de algodón; y auditar la identidad de
20 dicha marca de fibras de algodón en uno o más pasos usando un protocolo como se describe en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Amplificación por PCR de GhGluc1 en moldes de ácido nucleico aislados de material de fibras de algodón maduras (FM966 de *Gossypium*
5 *hirsutum*). Campo 1: marcador de peso molecular; campo 2: ADN molde de fibras purificadas (1 µl); campo 3: ADN molde de fibras no purificadas que contienen desperdicio de hojas (1 µl); campo 4: ADN molde de sólo desperdicio de hojas (1 µl); campo 5: ADN molde de fibras purificadas (5 µl); campo 6: ADN molde de fibras no purificadas que contienen desperdicio de hojas (5 µl); campo 7: ADN
10 molde de sólo desperdicio de hojas (5 µl); campo 8: sin control de ADN molde; campo 9: control positivo – ADN genómico aislado de materia vegetal de FiberMax966 (FM966).

Figura 2: Amplificación por PCR de GhGluc1 en moldes de ácido nucleico aislados de material de fibras de algodón maduras de FM966 de
15 *Gossypium hirsutum* y de material de fibras de algodón de 4 años de Pima Y5 de *Gossypium barbadense*. Campo 1: marcador de peso molecular; campos 2 a 3: ADN molde de fibras purificadas de FM966 que no contienen desperdicio de hojas (5 µl); campos 4 a 5: ADN molde de fibras no purificadas de FM966 que contienen desperdicio de hojas (5 µl); campo 6: ADN molde de desperdicio de hojas de
20 FM966 que no contienen material de fibras (5 µl); campos 7 a 8: ADN molde de fibras purificadas de Pima Y5 que no contienen desperdicio de hojas (5 µl); campo 9: sin control de ADN molde; campo 10: control positivo – ADN genómico aislado de materia vegetal de FiberMax966.

Figura 3: Amplificación por PCR de GhGluc1 en moldes de ácido
25 nucleico aislados a través de varios protocolos. Campo 1: marcador de peso

molecular; campo 2: ADN molde aislado por mini kit para plantas DNeasy® (5 µl);
campo 3: ADN molde aislado por mini kit para plantas DNeasy® (1 µl); campo 4:
ADN molde aislado por mini kit para plantas DNeasy® (1 µl); campo 5: ADN molde
aislado por mini kit para plantas DNeasy® (5 µl); campo 6: ADN molde aislado por
5 kit de purificación de ADN genómico Wizard® (1 µl); campo 7: ADN molde aislado
por kit de purificación de ADN genómico Wizard® (5 µl); campo 8: ADN molde
aislado por kit de purificación de ADN genómico Wizard® (1 µl); campo 9: ADN
molde aislado por kit de purificación de ADN genómico Wizard® (5 µl); campo 10:
ADN molde aislado por el procedimiento de CTAB (1 µl); campo 11: ADN molde
10 aislado por el procedimiento de CTAB (5 µl); campo 12: sin control de ADN molde;
campo 13: control positivo – ADN genómico aislado de materia vegetal de
FiberMax966.

Figura 4: Amplificación por PCR de GhGluc1 en moldes de ácido
nucleico aislados de ropa de algodón. Campos 1 y 8: marcador de peso molecular;
15 campo 2: ADN molde de ropa de algodón (luego de incubación) (1 µl); campo 3:
ADN molde de ropa de algodón (incubación por 30 minutos) (1 µl); campo 4: ADN
molde de ropa de algodón (luego de incubación) (5 µl); campo 5: ADN molde de
ropa de algodón (incubación por 30 minutos) (5 µl); campo 6: sin control de ADN
molde; campo 7: control positivo – material genómico aislado de materia vegetal
20 de FiberMax966.

Figura 5: Amplificación por PCR de GhGluc1 en moldes de ácido
nucleico aislados de camisas de algodón con diferentes ligamentos (tricotados o
tejidos). Campo 1: marcador de peso molecular; campo 2: ADN molde de camisa
de algodón tejida, luego de incubación, (1 µl); campo 3: ADN molde de camisa de
25 algodón tejida, luego de incubación, (5 µl); campo 4: ADN molde de camisa de

algodón tejida, luego de incubación, (1 μ l); campo 5: ADN molde de camisa de algodón tejida, luego de incubación, (5 μ l); campo 6: ADN molde de camisa de algodón tricotada, luego de incubación, (1 μ l); campo 7: ADN molde de camisa de algodón tricotada, luego de incubación, (5 μ l); campo 8: ADN molde de camisa de algodón tricotada, luego de incubación, (1 μ l); campo 9: ADN molde de camisa de algodón tricotada, luego de incubación, (5 μ l); campo 10: ADN molde de camisa de algodón tejida, 6 días de incubación, (1 μ l); campo 11: ADN molde de camisa de algodón tejida, 6 días de incubación, (5 μ l); campo 12: ADN molde de camisa de algodón tejida, 6 días de incubación, (1 μ l); campo 13: ADN molde de camisa de algodón tejida, 6 días de incubación, (5 μ l); campo 14: ADN molde de camisa de algodón tricotada, 6 días de incubación, (1 μ l); campo 15: ADN molde de camisa de algodón tricotada, 6 días de incubación, (5 μ l); campo 16: ADN molde de camisa de algodón tricotada, 6 días de incubación, (1 μ l); campo 17: ADN molde de camisa de algodón tricotada, 6 días de incubación, (5 μ l); campo 18: sin control de ADN molde; campo 19: control positivo – ADN genómico aislado de materia vegetal de FiberMax966.

Figura 6: Amplificación por PCR de NodC en moldes de ácido nucleico aislados de material de fibras de algodón transgénico maduro que contiene un gen quimérico que codifica para N-acetilglucosamina transferasa.

Campo 1: ADN molde de material de fibras transgénico, duplicado 1 (1 μ l); campo 2: ADN molde de material de fibras transgénico, duplicado 1 (5 μ l); campo 3: ADN molde de material de fibras transgénico, duplicado 2 (1 μ l); campo 4: ADN molde de material de fibras transgénico, duplicado 2 (5 μ l); campo 5: sin control de ADN molde; campo 6: control positivo – ADN genómico aislado de materia vegetal de algodón transgénico; campo 7: marcador de peso molecular.

Figura 7: Representación gráfica de la prueba Taqman de punto terminal que discrimina entre el alelo del subgenoma A de GhGluc1 de *Gossypium hirsutum* y de *Gossypium barbadense*. Muestras de ADN genómico preparadas de materia vegetal (hojas) de Pima (*G. barbadense*) o FM966 (*G. hirsutum*), ya sea en forma pura, o en mezclas de varias relaciones (75/25, 50/50 y 25/75), sometidas a una prueba de detección Taqman. El eje X indica la presencia del alelo *hirsutum* de Gluc1, mientras que el eje Y indica la presencia del alelo *barbadense* de Gluc1. En las muestras de ADN mixtas, el análisis Taqman permite la detección de las varias relaciones de ambos alelos.

Figura 8: Representación gráfica de la prueba Taqman de punto terminal que discrimina entre el alelo del subgenoma A de GhGluc1 de *Gossypium hirsutum* y de *Gossypium barbadense* en material de fibras y textil de camisa polo. Muestras de ADN genómico preparadas de materia vegetal (hojas) de Pima (*G. barbadense*) o FM966 (*G. hirsutum*), ya sea en forma pura, o en mezcla de 50/50 como muestras control. Ácidos nucleicos preparados de material de fibras (bala de FM966) o de material textil (polo), se sometieron a una prueba de detección Taqman. El eje X indica la presencia del alelo *hirsutum* de Gluc1, mientras que el eje Y indica la presencia del alelo *barbadense* de Gluc1. En el análisis, sólo se detectó el alelo *hirsutum*, indicando que todo el material de fibras y todo el material textil contiene sólo fibras de tipo *hirsutum*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES DE LA INVENCION

Los métodos actualmente descritos, se basan en el hallazgo inesperado de que es posible extraer macromoléculas biológicas (diferentes de

polisacáridos) tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, ADN o ARN, de fibras vegetales maduras y/o procesadas, en particular de fibras de semilla tales como las fibras de algodón. Además, el ADN aislado demostró ser de calidad suficiente para ser utilizable para más procesamiento, permitiendo la
5 caracterización de las fibras, por ejemplo, usando pruebas de detección, tales como amplificaciones basadas en reacción en cadena de polimerasa.

De esta manera, en una primera modalidad, la invención provee un método para una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, que comprende los pasos de aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica
10 de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal, diferente de polisacáridos o lignina; y caracterizar la información codificada en la secuencia de los monómeros de dicha macromolécula biológica.

Como se usa en la presente, una "fibra vegetal madura" es una fibra que ha completado su ciclo de desarrollo, y se considera que es el remanente de
15 una célula muerta. En particular, una fibra vegetal madura es una fibra vegetal después de que ha sido cosechada del cultivo de fibras que produce la fibra vegetal. Par el algodón, por ejemplo, una fibra madura sería considerada las fibras como están presentes en las balas de algodón recolectadas en la cosecha. Quedará claro que las fibras vegetales maduras comprenden todas las fibras
20 vegetales procesadas por la industria de las fibras.

Una "fibra vegetal procesada", como se usa en la presente, es una fibra vegetal madura como se cosecha de la planta de cultivo, la cual ha sufrido tratamientos mecánicos, térmicos y/o químicos adicionales, que incluyen encerado, teñido, cardado, hilatura, tejeduría, encolado, mercerización, etc. (véase
25 la sección de antecedentes de la invención).

El término “fibras vegetales”, como se usa en la presente, se refiere a células cónicas estrechas largas de origen vegetal, muertas y huecas en la madurez, con una pared celular gruesa rígida compuesta principalmente de celulosa y lignina.

5 Las “fibras de semilla”, como se usan en la presente, son fibras desarrolladas de la superficie de semillas tales como el algodón. El término “algodón”, como se usa en la presente, incluye *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense*, incluyendo “plantas progenitoras de algodón”, tales como *Gossypium arboreum*, *Gossypium herbaceum* y *Gossypium raimondii* y *Gossypium longicalyx*.

10 Una “macromolécula biológica” de ocurrencia natural en una célula de fibra vegetal”, es una macromolécula biológica que no ha sido añadida exógenamente a dicha fibra vegetal, por ejemplo, a través de incubación o inyección con una molécula tal como una molécula de ADN extraña, péptido o proteína para marcar las fibras vegetales, y la cual incluye todas las
15 macromoléculas, es decir, moléculas de naturaleza polimérica que tienen un contenido de información. El contenido de información será usualmente codificado en la secuencia de los bloques estructurales o monómeros. Ejemplos de macromoléculas biológicas son polipéptidos, proteínas, y ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, sean de cadena sencilla o de doble cadena.

20 El término “caracterización de una macromolécula biológica”, como se usa en la presente, significa decodificar el contenido de información de la macromolécula biológica. Esto puede hacerse convenientemente sometiendo la macromolécula biológica a una serie de análisis, que incluyen determinación de la secuencia de monómeros de los cuales la macromolécula está compuesta, pero

sometiendo también la macromolécula biológica a una o más pruebas de detección específicas.

Una "prueba de detección", como se usa en la presente, es un método o protocolo dirigido a encontrar una secuencia específica de monómeros
5 en una macromolécula biológica. Esto puede incluir pruebas de detección basadas en amplificación basada en reacción en cadena de polimerasa, detección de anticuerpos o hibridación de ácidos nucleicos.

Se ha demostrado que los métodos de extracción particulares, mientras que tienen una influencia sobre la calidad de la macromolécula biológica
10 extraída, no son críticos para la capacidad de poder extraer dichas macromoléculas biológicas de fibras vegetales.

Sin embargo, se ha encontrado inesperadamente que la calidad y/o la cantidad de las macromoléculas biológicas, en particular la fracción de ácido nucleico de las mismas, aisladas de fibras vegetales maduras y/o procesadas,
15 pueden ser mejoradas ampliamente por varias medidas.

Puede ser ventajoso, por ejemplo, dejar que las fibras vegetales sean analizadas por un tiempo prolongado en un regulador de pH de lisis que contenga detergentes y posiblemente otros constituyentes. En particular, se ha encontrado que la incubación de fibras vegetales maduras y/o procesadas por un período de
20 por lo menos 30 minutos, pero más preferiblemente por un período de por lo menos 4 horas hasta 120 horas en un regulador de pH de lisis, de preferencia a temperatura ambiente, mejorará el rendimiento de las macromoléculas biológicas recuperadas, en particular la fracción de ácido nucleico de las mismas.

Se ha determinado también que removiendo cuidadosamente
25 impurezas, que incluyen remanentes de hojas, resinas y otros desperdicios de las

fibras vegetales, tales como fibras de algodón cosechadas y/o desmotadas, antes del aislamiento de las macromoléculas biológicas, se mejora ampliamente la calidad de los ácidos nucleicos aislados, en particular con respecto a más análisis y facilidad de empleo de los ácidos nucleicos aislados.

5 Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas que contienen eventos de transformación, o combinación de eventos de transformación, que pueden ser la materia de peticiones para estado no regulado, en los Estados Unidos de Norteamérica, al Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)
10 del United States Department of Agriculture (USDA), ya sea que dichas peticiones sean concedidas o estén aún pendientes, incluyendo los siguientes eventos:

Evento de transformación	Petición	Fenotipo transgénico
COT67B	07-108-01p	resistente a lepidópteros
GHB614	06-332-01p	tolerante a glifosato
MON88913	04-086-01p	tolerante a glifosato
COT102	03-155-01p	resistente a lepidópteros
281-24-236	03-036-01p	resistente a lepidópteros
3006-210-23	03-036-02p	resistente a lepidópteros
LLCotton25	02-042-01p	tolerante a fosfinotricina
MON15985	00-342-01p	resistente a lepidópteros
31807&31808	97-013-01p	tolerante a bromoxinilo y resistente a lepidópteros
19-51a	95-256-01p	tolerante a sulfonilurea
MON 1445, 1698	95-045-01p	tolerante a glifosato
MON 531,757,1076	94-308-01p	resistente a lepidópteros
BXN	93-196-01p	tolerante a bromoxinilo

20

Para este fin, las macromoléculas biológicas, en particular los ácidos nucleicos tales como el ADN, pueden ser sometidos a una prueba de detección diseñada específicamente para detectar los eventos de transformación. Dichas
25 pruebas de detección incluyen las pruebas publicadas en <http://gmo->

crl.jrc.it/statusofdoss.htm por lo menos para los eventos MON1445, MON531, MON15985, LLCotton25, 3006-210-23 y 281-24-236. Información adicional tal como secuencias de nucleótidos de la secuencia de flanqueo de la planta adyacente al ADN insertado en estos eventos de transformación (después de lo

5 cual pueden diseñarse pruebas de detección de ADN específicas de la información), puede encontrarse en las siguientes solicitudes de patente:

	Nombre del evento	Fenotipo	Solicitud de patente
	CE43-67B	Resistencia a insectos (Cry1Ab)	WO2006/128573
	CE46-02A	Resistencia a insectos (Cry1Ab)	WO2006/128572
	CE44-69D	Resistencia a insectos (Cry1Ab)	WO2006/128571
	1143-14A	Resistencia a insectos (Cry1Ab)	WO2006/128569
	T342-142	Resistencia a insectos (Cry1Ab)	WO2006/128568
10	evento 3006-210-23	Resistencia a insectos (Cry1Ac)	WO2005103266
	PV-GHGT07 (1445)	Tolerancia a glifosato	US2004-148666
	MON88913	Tolerancia a glifosato	WO2004/072235
	EE-GH3	Tolerancia a glifosato	WO2007/017186
	T303-40	Resistencia a insectos	PCT/EP2008/002667
	GHB119	Resistencia a insectos	PCT/EP2008/004652
	Cot202	Resistencia a insectos (VIP3)	US2007-067868
	LLcotton25	Resistencia a glufosinato	WO2007/017186
	evento 281-24-236	Resistencia a insectos (Cry1F)	WO2005103266
	Cot102	Resistencia a insectos (Vip3A)	US2006-130175
15	MON15985	Resistencia a insectos	US2004-250317

Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas de algodón que contienen material genético que imparte rasgos útiles particularmente ventajosos a

20 estas plantas. Ejemplos de dichos rasgos, son mejor crecimiento de la planta, tolerancia incrementada a tensiones abióticas tales como altas o bajas temperaturas, sequía, contenido extremo de agua o sales o minerales en el suelo, cualidades de floración incrementadas, cosecha más fácil, maduración acelerada, mayores rendimientos de cosecha de partes de la planta comercialmente

25 relevantes (por ejemplo, semillas), mayor calidad y/o mayor valor nutricional de los

productos cosechados, y mejores estabilidad en almacenamiento y/o facilidad de empleo de los productos cosechados. Otros ejemplos y en particular ejemplos enfatizados de dichos rasgos, son resistencia contra tensiones bióticas, es decir, mejor defensa de las plantas contra plagas de animales y microbios, tal como
5 contra insectos, ácaros, hongos, fitopatógenos, bacterias y/o virus, y también tolerancia incrementada de las plantas a ciertos compuestos herbicidamente activos.

Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas de algodón que
10 contienen material genético que imparte resistencia a herbicidas, por ejemplo, plantas tolerantes a glifosato, es decir, plantas hechas tolerantes al herbicida glifosato, o sales del mismo. Puede hacerse que las plantas sean tolerantes a glifosato a través de diferentes medios. Por ejemplo, pueden obtenerse plantas tolerantes a glifosato, transformando la planta con un gen que codifique para la
15 enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Ejemplos de dichos genes de EPSPS, son el gen AroA (CT7 mutante) de la bacteria *Salmonella typhimurium* (Comai *et al.*, 1983, Science 221, 370-371), el gen CP4 de la bacteria *Agrobacterium* sp. (Barry *et al.*, 1992, Curr. Topics Plant Physiol. 7, 139-145), los genes que codifican para una EPSPS de petunia (Shah *et al.*, 1986, Science 233,
20 478-481), una EPSPS del tomate (Gasser *et al.*, 1988, J. Biol. Chem. 263, 4280-4289) o una EPSPS de *Eleusine* (véase el documento WO 01/66704). Puede ser también una EPSPS mutada como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0837944, WO 00/66746, WO 00/66747 o WO02/26995. Pueden obtenerse también plantas tolerantes a glifosato, expresando un gen que codifique para una
25 enzima glifosato óxido reductasa como se describe en las patentes de E.U.A. Nos.

5,776,760 y 5,463,175. Pueden obtenerse también plantas tolerantes a glifosato, expresando un gen que codifique para una enzima glifosato acetil transferasa como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 02/36782, WO 03/092360, WO 05/012515 y WO 07/024782. Pueden obtenerse también plantas tolerantes a glifosato, seleccionando plantas que contengan mutaciones de ocurrencia natural de los genes mencionados anteriormente como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 01/024615 o WO 03/013226. Otras plantas resistentes a herbicidas son, por ejemplo, plantas que son hechas tolerantes a herbicidas que inhiben la enzima glutamina sintasa, tales como bialafós, fosfinotricina o glufosinato. Dichas plantas pueden obtenerse expresando una enzima que destoxifique el herbicida o una enzima glutamina sintasa mutante que sea resistente a la inhibición. Una de dichas enzimas destoxificantes eficientes, es una enzima que codifica para una fosfinotricina acetiltransferasa (tal como la proteína bar o pat de especies de *Streptomyces*). Plantas que expresan una fosfinotricina acetiltransferasa exógena se describen, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 5,561,236; 5,648,477; 5,646,024; 5,273,894; 5,637,489; 5,276,268; 5,739,082; 5,908,810 y 7,112,665. Otras plantas tolerantes a herbicidas, son también plantas que son hechas tolerantes a los herbicidas que inhiben la enzima hidroxifenilpiruvatodioxigenasa (HPPD). Las hidroxifenilpiruvatodioxigenasas son enzimas que catalizan la reacción en la cual el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) es transformado en homogentisato. Las plantas tolerantes a inhibidores de HPPD pueden ser transformadas con un gen que codifique para una enzima HPPD resistente de ocurrencia natural, o un gen que codifique para una enzima HPPD mutada como se describe en los documentos WO 96/38567, WO 99/24585 y WO 99/24586. Puede obtenerse también tolerancia a inhibidores de HPPD,

transformando plantas con genes que codifiquen para ciertas enzimas que permiten la formación de homogentisato a pesar de la inhibición de la enzima HPPD nativa por el inhibidor de HPPD. Dichas plantas y genes se describen en los documentos WO 99/34008 y WO 02/36787. La tolerancia de las plantas a los

5 inhibidores de HPPD puede ser mejorada también transformando plantas con un gen que codifique para una enzima prefenato deshidrogenasa, además de un gen que codifique para una enzima tolerante a HPPD, como se describe en el documento WO 2004/024928. Otras plantas resistentes a herbicidas, son plantas que son hechas tolerantes a inhibidores de acetolactato sintasa (ALS). Inhibidores

10 de ALS conocidos incluyen, por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidinas, pirimidinioxi(tio)benzoatos y/o sulfonilaminocarboniltriaolinona. Se conocen diferentes mutaciones en la enzima ALS (conocida también como acetohidroxiácido sintasa, AHAS) que confieren resistencia a diferentes herbicidas y grupos de herbicidas, como se describe, por ejemplo, en Tranel y Wright (2002,

15 Weed Science 50: 700-712), pero también en las patentes de E.U.A. No. 5,605,011, 5,378,824, 5,141,870 y 5,013,659. La producción de plantas tolerantes a sulfonilurea y plantas tolerantes a imidazolinona se describe en las patentes de E.U.A. Nos. 5,605,011; 5,013,659; 5,141,870; 5,767,361; 5,731,180; 5,304,732; 4,761,373; 5,331,107; 5,928,937; y 5,378,824; y en la publicación internacional

20 WO 96/33270. Otras plantas tolerantes a imidazolinona se describen también, por ejemplo, en los documentos WO 2004/040012, WO 2004/106529, WO 2005/020673, WO 2005/093093, WO 2006/007373, WO 2006/015376, WO 2006/024351 y WO 2006/060634. Otras plantas tolerantes a sulfonilurea e imidazolinona se describen también, por ejemplo, en el documento WO

25 07/024782.

Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas de algodón que contienen material genético que imparte resistencia al ataque por ciertos insectos objetivo. Dichas plantas pueden obtenerse por transformación genética, o por
5 selección de plantas que contengan una mutación que imparta dicha resistencia a insectos, y pueden contener por lo menos un transgen que comprende una secuencia codificante que codifica para:

1) una proteína cristalina insecticida de *Bacillus thuringiensis* o una porción insecticida de la misma, como es el caso de las proteínas cristalinas
10 insecticidas enlistadas por Crickmore *et al.* (1998, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 807-813), actualizadas por Crickmore *et al.* (2005) en la nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* en línea en la dirección: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/), o porciones insecticidas de las mismas, por ejemplo, proteínas de las clases de proteínas Cry Cry1Ab,
15 Cry1Ac, Cry1F, Cry2Ab, Cry3Aa o Cry3Bb, o porciones insecticidas de las mismas; o

2) una proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis* o una porción de la misma que es insecticida en presencia de una segunda proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis*, o una porción de la misma, tal como la toxina binaria
20 obtenida de las proteínas cristalinas Cry34 y Cry35 (Moellenbeck *et al.* 2001, Nat. Biotechnol. 19: 668-72; Schnepf *et al.* 2006, Applied Environm. Microbiol. 71, 1765-1774); o

3) una proteína insecticida híbrida que comprende partes de diferentes proteínas cristalinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*, tal como un
25 híbrido de las proteínas del inciso 1) anterior, o un híbrido de las proteínas del

inciso 2) anterior, por ejemplo, la proteína Cry1A.105 producida por el evento del maíz MON98034 (WO 2007/027777); o

4) una proteína de cualquiera de los incisos A1) a A3) anteriores, en donde algunos aminoácidos, en particular 1 a 10, han sido reemplazados por otro aminoácido para obtener una actividad insecticida superior a una especie de insecto objetivo, y/o para expandir el rango de especies de insectos objetivo afectados, y/o debido a los cambios introducidos en el ADN codificante durante la clonación o transformación, tal como la proteína Cry3Bb1 en los eventos de maíz MON863 o MON88017, o la proteína Cry3A en el evento de maíz MIR604;

5) una proteína insecticida secretada de *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus cereus*, o una porción insecticida de la misma, tal como las proteínas insecticidas vegetativas (VIP) enlistadas en: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, por ejemplo, las proteínas de la clase de proteínas VIP3Aa; o

6) una proteína secretada de *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus cereus*, que es insecticida en presencia de una segunda proteína secretada de *Bacillus thuringiensis* o *B. cereus*, tal como la toxina binaria formada de las proteínas VIP1A y VIP2A (véase el documento WO 94/21795); o

7) una proteína insecticida híbrida que comprende partes de diferentes proteínas secretadas de *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus cereus*, tal como un híbrido de las proteínas en el inciso 1) anterior o un híbrido de las proteínas en el inciso 2) anterior; o

8) una proteína de cualquiera de los incisos 1) a 3) anteriores, en donde algunos aminoácidos, en particular 1 a 10, han sido reemplazados por otro aminoácido para obtener una mayor actividad insecticida hacia una especie de

insecto objetivo, y/o para expandir el rango de especies de insectos objetivo afectados, y/o debido a los cambios introducidos en el ADN codificante durante la clonación o transformación (mientras aún codifica para una proteína insecticida), tal como la proteína VIP3Aa en el evento de algodón COT102.

5 Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas de algodón que contienen material genético que imparte tolerancia a tensiones abióticas. Dichas plantas pueden obtenerse por transformación genética, y pueden contener uno o más de los siguientes transgenes:

10 a. un transgen capaz de reducir la expresión y/o la actividad del gen de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) en las células de la planta o las plantas, como se describe en los documentos WO 00/04173 o EP 04077984.5 o EP 06009836.5.

b. un transgen que aumenta la tolerancia al estrés, capaz de reducir
15 la expresión y/o la actividad de los genes que codifican para PARG de las plantas o células de la planta como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2004/090140.

c. un transgen que aumenta la tolerancia al estrés, que codifica para una enzima funcional en las plantas de la vía de síntesis silvestre de nicotinamida
20 adenín dinucleótido que incluye nicotinamidasa, nicotinato fosforribosiltransferasa, ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa, nicotinamida adenín dinucleótido sintetasa o nicotinamida fosforribosiltransferasa como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 04077624.7 o WO 2006/133827 o PCT/EP07/002433.

Los métodos de la presente invención pueden usarse en forma ventajosa para identificar fibras de algodón derivadas de plantas de algodón que contienen material genético que puede modificar las características de la fibra, tales como resistencia, longitud, micronaire etc., incluyendo los genes quiméricos descritos en los documentos WO05/017157 (genes de silenciamiento de glucanasa), WO04/0655571 (genes que codifican para quitinasa), WO02/45485 y WO08/012058 (genes de sacarosa sintasa), WO01/17333 (genes de sacarosa fosfato sintetasa), WO98/00549 (genes de celulosa sintasa), WO06/133827 (genes de N-acetilglucosamina transferasa tal como una quitina sintasa o genes que codifican para NODC).

Otra aplicación para los métodos de la presente invención, es identificar fibras vegetales, tales como fibras de algodón de plantas que comprenden variaciones alélicas específicas de genes particulares. Los métodos para identificar dichas variaciones alélicas, son bien conocidos en la técnica. En particular, dichas variaciones alélicas pueden usarse para diferenciar entre las fibras de especies de plantas particulares tales como, por ejemplo, diferenciación entre las fibras de *G. barbadense* y *G. hirsutum*. Como un ejemplo, el polimorfismo entre el alelo del subgenoma A de glucanasa1 de *Gossypium barbadense* y de *Gossypium hirsutum* (por la presencia de un codón de detención en la región codificante del alelo del subgenoma A de Gluc1 en *G. barbadense*, como se describe en la solicitud EP no publicada 08075514.3, incorporada en la presente como referencia), puede usarse para diferenciar las fibras que se originan de *Gossypium barbadense* o *Gossypium hirsutum*.

Los métodos descritos en la presente pueden usarse también para aislar moldes de ácido nucleico que pueden usarse para cualquier protocolo de

caracterización del genoma, incluyendo AFLP, READS, y similares. Los moldes de ácido nucleico aislados de las fibras maduras o procesadas, pueden ser amplificados usando métodos conocidos en la técnica, tales como la amplificación del genoma entero, antes de la aplicación de un protocolo de caracterización del
5 genoma.

Los métodos descritos en la presente pueden usarse también para facilitar programas de certificación, garantizando el suministro de fibras vegetales vendidas comercialmente, tales como fibras de algodón que tienen características particularmente especificadas. Usualmente, dichos programas de certificación
10 incluyen el registro de la compra de semillas certificadas por agricultores registrados, por los cuales la semilla de algodón comprende una composición específica del genoma y produce una marca particular de fibras vegetales. Las balas de las fibras vegetales cosechadas producidas por los agricultores registrados de dichas semillas certificadas, son registradas y autenticadas por
15 verificación cruzada con dichos registros de compra de la semilla, y son provistas a molinos para producir de preferencia predominantemente, en particular exclusivamente, hilos, telas o indumentaria de dicha marca de fibras. Los métodos descritos en la presente permiten realizar auditorías en diferentes puntos en la cadena de suministro.

20 Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse también para aislar macromoléculas biológicas de estructuras tipo filamento (tipo tricoma) en las semillas de la planta, tales como los filamentos en las semillas del tomate o los filamentos llevados sobre la base de las semillas de trigo.

Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse también para
25 caracterizar el material de ácido nucleico de fibras añejas y material textil añejo

(por ejemplo, fibras y textiles que tienen más de 100 años). Sin que se limite la invención a una teoría o mecanismo específico, se cree que una posibilidad de que el material biológico sea preservado en las fibras añejas, es porque se ha observado que las fibras maduras están retorcidas, de modo que el material biológico es "atrapado" (y de esta manera "preservado") en las fibras maduras.

Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse también en aplicaciones forenses, debido a que material textil o de fibra identificado en una escena de crimen, puede ser caracterizado, por ejemplo, precediendo a un paso de amplificación del genoma entero como se muestra en el ejemplo 6 en esta solicitud.

Como se usa en la presente, se interpretará que el término "que comprende" especifica la presencia de las características, enteros, pasos o componentes establecidos referidos, pero no excluye la presencia o la adición de uno o más rasgos, enteros, pasos o componentes, o grupos de los mismos. De esta manera, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos de los que realmente se citan, es decir, incluidos en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una región de ADN, la cual es funcionalmente o estructuralmente definida, puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

Los siguientes ejemplos no limitativos describen los métodos para aislar macromoléculas biológicas de fibras vegetales maduras y de fibras procesadas, y su uso para caracterizar o identificar fibras vegetales. A menos que se indique de otra manera en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar, como se

describe en Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA. Materiales y métodos estándar para trabajo molecular en plantas, 5 se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

A lo largo de la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias representadas en el listado de secuencias:

- 10 SEQ ID No 1: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de Ghgluc1
- SEQ ID No 2: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de Ghgluc1
- SEQ ID No 3: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de NodC
- 15 SEQ ID No 4: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de NodC
- SEQ ID No 5: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de expansina
- SEQ ID No 6: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de expansina
- 20 SEQ ID No 7: oligonucleótido 1 para prueba de detección Taqman, de GhGluc1 (iniciador delantero)
- SEQ ID No 8: oligonucleótido 2 para prueba de detección Taqman, de GhGluc1 (iniciador inverso)

SEQ ID No 9: oligonucleótido 3 para prueba de detección Taqman, del alelo A subgenómico de GhGluc1 (oligonucleótido marcado con VIC que detecta el alelo de Gluc1 de *G. hirsutum*)

5 SEQ ID No 10: oligonucleótido 4 para prueba de detección Taqman, del alelo A subgenómico de GhGluc1 (oligonucleótido marcado con FAM que detecta el alelo de Gluc1 de *G. barbadense*)

SEQ ID No 11: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de rp116

10 SEQ ID No 12: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de rp116

SEQ ID No 13: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de matK

SEQ ID No 14: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de matK

SEQ ID No 15: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de trnT-trnL

15 SEQ ID No 16: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de trnT-trnL

SEQ ID No 17: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de ndhF

SEQ ID No 18: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de ndhF.

20

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Aislamiento de ácidos nucleicos de material de fibras de algodón en bruto

25

A. Aislamiento de ácidos nucleicos del material de fibras FM966 de *Gossypium hirsutum*

Fibras de algodón cosechadas de FM966, que habían sido desmotadas y embaladas, se sometieron a extracción de ADN usando el procedimiento de CTAB convencional (bromuro de hexadecil trimetil amonio) (Doyle y Doyle, 1987, Phytochem. Bull. 19, 11) para el aislamiento de ADN genómico de la materia vegetal. Aunque se obtuvo una pella de ácidos nucleicos, este material no pudo usarse para alguna otra aplicación incluyendo amplificación por PCR, o digestión con enzimas de restricción.

Las fibras de algodón en bruto embaladas cosechadas contienen aún algunas impurezas tales como restos de hojas y otras impurezas. Estos materiales contaminantes se removieron cuidadosamente por limpieza manual, para obtener una fracción de fibras purificada (y una fracción de impurezas). El material de fibras en bruto, el material de fibras purificado y la fracción de impurezas, se sometieron a extracción de ADN usando el mini kit para plantas DNeasy® comercializado por QIAGEN, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (véase el manual para plantas DNeasy® disponible en www1.qiagen.com/HB/DNeasyPlantMiniMaxi), y se determinaron las concentraciones de los ácidos nucleicos aislados usando espectrofotometría UV (cuadro 1).

CUADRO 1

Muestra	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
Fibra pura	3.49	0.07	0.05	1.41	0.52
Fibra pura	4.19	0.084	0.065	1.29	0.51
Fibra en bruto	14.91	0.298	0.194	1.54	0.43
Fibra en bruto	17.4	0.348	0.239	1.46	0.43
Sólo impurezas	76.55	1.531	1.09	1.4	0.45

Los ácidos nucleicos aislados se usaron como moldes en una reacción de PCR estándar, usando los siguientes iniciadores para detectar un gen endógeno de glucanasa de algodón (GhGluc1; véase el documento EP 08075514.3 incorporado en la presente como referencia para secuencias de

5 nucleótidos de diferentes alelos de GhGluc1):

SE002: ggccgaagccgatcttatctagg (SEQ ID No.: 1)

SE003: cggcaacaatcttccatctccag (SEQ ID No.: 2)

Se usaron 1 µl y 5 µl de ácidos nucleicos molde. Los resultados de la amplificación por PCR se visualizan en la figura 1. Un amplicón de 656 pb (como

10 era de esperarse) se detecta claramente usando fibra pura (molde de 5 µl) (campo 4), mientras que puede observarse una señal débil usando una pequeña cantidad (1 µl) de ácidos nucleicos aislados del material de fibras en bruto y puro. No pudo detectarse señal de amplificación alguna en los ácidos nucleicos aislados de sólo el material de impurezas, ni de los ácidos nucleicos obtenidos del material no

15 purificado cuando se usó en mayores concentraciones, indicando que el extracto obtenido de los materiales contaminantes parece inhibir el procesamiento adicional de los ácidos nucleicos obtenidos del material de fibras en bruto.

De modo interesante, este experimento demuestra que pueden extraerse ácidos nucleicos, los cuales pueden analizarse adicionalmente, del

20 material de fibras de algodón maduras. El experimento indica también que la calidad de los ácidos nucleicos aislados – el ADN puede mejorarse además removiendo el desperdicio de hojas y otras impurezas de las fibras de algodón en bruto cosechadas y desmotadas.

B. Aislamiento de ácidos nucleicos del material de fibras Pima-Y5 de *Gossypium barbadense*

Un material de fibras de algodón en bruto de 4 años de Pima5Y de *Gossypium barbadense*, se trató junto con el material de fibras de algodón FM966 de *Gossypium hirsutum*, como se describió anteriormente en 1.A. Los ácidos nucleicos obtenidos se usaron como moldes en reacciones de PCR como se describe en 1.A. Los resultados se visualizan en la figura 2.

Aunque las fibras de *Gossypium barbadense* son más fuertes y tienen una diferente arquitectura de las fibras de *Gossypium hirsutum*, los resultados demuestran que los ácidos nucleicos que incluyen ADN procesable pueden aislarse también de estas fibras. De modo interesante, estas fibras se habían almacenado también por varios años bajo condiciones no óptimas, indicando que ADN procesable u otros ácidos nucleicos pueden obtenerse de material de fibras añejo.

15

C. Amplificación de otros genes endógenos del algodón

Los ácidos nucleicos aislados se usaron también como moldes en reacciones de PCR estándar, usando iniciadores específicos para otros genes endógenos tales como los siguientes iniciadores que amplifican un fragmento de 299 pb del gen que codifica para expansina:

K151: gggagcttggtgttatggaaacc (SEQ ID No.: 5)

K152: cagggacgatcccagctcgatattc (SEQ ID No.: 6)

Los amplicones esperados pudieron detectarse también usando estos otros iniciadores para otros genes endógenos.

25

D. Aislamiento de ácidos nucleicos del material de fibras del algodón
usando otros reguladores de pH de lisis y protocolos

Se purificó material de fibras del algodón en bruto como se describió en la sección 1.A., removiendo el material de desperdicio de hojas contaminante y otras impurezas. Se extrajeron ácidos nucleicos del material de fibras purificado usando el mini kit para plantas DNeasy® comercializado por QIAGEN, o el kit de purificación de ADN genómico Wizard® comercializado por PROMEGA CORPORATION, o el procedimiento de CTAB convencional (Doyle y Doyle, 1987, Phytochem. Bull. 19, 11). La concentración de los ácidos nucleicos obtenidos se determinó usando espectrofotometría UV (cuadro 2).

CUADRO 2

Muestra	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
Qiagen 1	7.66	0.153	0.069	2.21	1.4
Qiagen 2	19.97	0.399	0.241	1.66	0.76
Promega 1	21.34	0.427	0.208	2.05	1.42
Promega 2	38.14	0.763	0.389	1.96	1.06
CTAB*	225.22	4.504	2.235	2.02	1.42

*Nota: Lecturas de alta concentración debidas probablemente a la ausencia del tratamiento con ribonucleasa.

Los ácidos nucleicos aislados se usaron como moldes en una reacción de PCR estándar, usando los siguientes iniciadores para detectar un gen endógeno de glucanasa de algodón (GhGluc1; véase el documento EP 08075514.3, incorporado en la presente como referencia para secuencias de nucleótidos de diferentes alelos de GhGluc1):

SE002: ggccgaagccgatcttatctagg (SEQ ID No.: 1)

SE003: cggcaacaatcttccatctccag (SEQ ID No.: 2)

Se usaron 1 µl y 5 µl de ácidos nucleicos molde. Los resultados de la amplificación por PCR se visualizan en la figura 3. El amplicón de ADN esperado se observó usando ácidos nucleicos molde aislados por cualquier método, aunque las concentraciones aparentemente mayores de los ácidos nucleicos (reacción de 5 µl) aislados por los procedimientos Wizard® y CTAB, tuvieron un efecto negativo sobre la reacción de PCR.

Aunque con una menor eficiencia, se observó que los ácidos nucleicos podrían extraerse también del material de fibras depurado incubando este material de fibras con agua (H₂O) por una cierta cantidad de tiempo (por ejemplo, por lo menos 4 horas de incubación del material de fibras depurado en presencia de un volumen de agua).

15

EJEMPLO 2

Aislamiento de ácidos nucleicos de textiles

A. Aislamiento de ácidos nucleicos de ropa de algodón

El aislamiento exitoso de ácidos nucleicos tales como el ADN, el cual puede ser procesado adicionalmente de fibras de algodón maduras, estimuló un intento por aislar macromoléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, en particular ADN procesable de fibras después de hilatura y tejeduría. Para este fin, se aislaron hilos destejendo una pieza de ropa de algodón cortada en piezas más

25

pequeñas e incubada en 5 ml de regulador de pH de lisis (regulador de pH AP1 DNeasy®) a 65°C por cuando menos 30 minutos o durante la noche a temperatura ambiente. Se exprimió el regulador de pH del material y se transfirieron 500 µl del lisado a un tubo Eppendorf, y se trataron adicionalmente de acuerdo con las
5 recomendaciones del fabricante, es decir:

- añadir 130 µl de regulador de pH AP2, mezclar e incubar en hielo por 5 minutos
- centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm
- transferir la fase líquida a la columna mini spin QIAshredder lila
- 10 - centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm
- transferir el flujo pasante a un nuevo tubo Eppendorf sin que se perturbe la pella
- añadir 800 µl de regulador de pH AP3/E y mezclar
- transferir 650 µl a la columna mini spin DNeasy®, y centrifugar por
15 1 minuto a 8000 rpm, desechando el flujo pasante
- repetir este paso con la muestra restante; desechar el tubo de colecta y poner la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml
- lavar la columna con 500 µl de regulador de pH AW y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, desechar el flujo pasante
- 20 - lavar la columna con 500 µl de regulador de pH AW y centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm, desechar el flujo pasante
- poner la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sin sobrante de etanol
- añadir 50 µl de agua a la columna e incubar por cuando menos 5
25 minutos a temperatura ambiente

- centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Almacenar el ADN a 4°C.

Se usaron muestras de 1 y 5 µl como ADN molde en una reacción de PCR, usando los iniciadores del ejemplo 1.A. Los resultados se visualizan en la figura 4. Cuando se usaron muestras de ácido nucleico después de incubación durante la noche, el amplicón esperado de 669 pb pudo detectarse, indicando que el protocolo puede usarse para aislar ácidos nucleicos de fibras de algodón después de hilatura y tejeduría. La señal de PCR significativamente más fuerte después de la incubación durante la noche contra la incubación por 30 minutos, indica que el primer protocolo resulta en una mayor concentración de ADN procesable.

B. Aislamiento de ácidos nucleicos de textiles con diferentes ligamentos

El protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos se aplicó también a indumentaria acabada con diferentes ligamentos (es decir, la cual ha sufrido diferente procesamiento). Para este fin, se cortaron piezas de una camisa de manga larga de algodón (tejida) y de una camisa polo de algodón (tricotada) y se trataron como en el ejemplo 2A, salvo que la incubación en el regulador de pH de lisis se realizó durante la noche, o incluso se prolongó hasta 6 días de incubación. Una reacción de PCR como se describió en el ejemplo 2.A se realizó en los ácidos nucleicos aislados, y los resultados se visualizan en la figura 5.

El amplicón esperado se detectó después de la amplificación por PCR, usando muestras de ácido nucleico aisladas de ambos tipos de telas. De nuevo, la señal fue más fuerte en las muestras en las cuales la incubación en el regulador de pH de lisis se había prolongado.

EJEMPLO 3

Aislamiento de ácidos nucleicos de fibras de especialidad

Fibras maduras se aislaron y se purificaron de plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen quimérico de N-acetilglucosamina transferasa ("gen de NodC"), como se describe en el ejemplo 1 del documento WO2006/136351. Se aislaron ácidos nucleicos de la extracción de fibras purificadas, usando el mini kit para plantas DNeasy® comercializado por QIAGEN, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (véase el manual para plantas DNeasy® disponible en www1.qiagen.com/HB/DNeasyPlantMiniMaxi), y las concentraciones de los ácidos nucleicos aislados se determinaron usando espectrofotometría UV (cuadro 3).

CUADRO 3

Muestra	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
NodC1	7.95	0.159	0.105	1.51	0.56
NodC2	7.62	0.152	0.101	1.51	0.56

Los ácidos nucleicos aislados se usaron también como moldes en reacciones de PCR estándar usando iniciadores específicos para otros genes endógenos, tales como los siguientes iniciadores que amplifican un fragmento de 1224 pb del gen que codifica para NodC:

ldb093: cgttttcactcatcgctgtttcaagtgtcgtagatgtgatcggttgcttgcg (SEQ ID No.: 3)

ldb126: ggcgcgcccttaggaactctcgcgtagtagccac (SEQ ID No.: 4)

Se usaron 1 µl y 5 µl de ácidos nucleicos molde. Los resultados de la amplificación por PCR se visualizan en la figura 6. El amplicón de ADN esperado, indicativo de la presencia del transgen, pudo observarse en cada muestra.

EJEMPLO 4

5 **Automatización y diferenciación entre diferentes tipos de fibras**

Como se describe en la solicitud EP no publicada 08075514.3, incorporada en la presente como referencia, el alelo del subgenoma A de glucanasa1 de *Gossypium barbadense* difiere del alelo del subgenoma de glucanasa1 de *Gossypium hirsutum*, por la presencia de un codón de detención en la región codificante del alelo de subgenoma A de Gluc1 en el primero. Este polimorfismo pudo usarse para diferenciar entre fibras de algodón de plantas que tienen el alelo Gluc1 de *Gossypium barbadense* o el alelo Gluc1 de *Gossypium hirsutum*. Para este fin, se diseñó una prueba Taqman®, por la cual los oligonucleótidos iniciadores que amplifican un fragmento de ADN que posee el polimorfismo usado fueron:

Iniciador delantero: GCTTTTGGAAGCGATATAACATCGA (SEQ ID No.: 7)

Iniciador inverso: GGCATAGGCAAAATAAGGGTACACA (SEQ ID No.: 8)

El polimorfismo se detectó por el monitoreo de la degradación de los siguientes iniciadores marcados con fluorescencia que detectan el polimorfismo:

VIC - AATCCTGTCTGAACCAG (alelo de *hirsutum*) (SEQ ID No.: 9)

FAM - ATCCTGTCAAACCAG (alelo de *barbadense*) (SEQ ID No.:

25 10)

Estos iniciadores se usaron en un sistema de qPCR, aumentando el número de ciclos hasta 60 y determinando la fluorescencia sólo en el punto terminal. Como moldes de ácido nucleico, se usaron mezclas de ADN aislado de fibras de *G. barbadense* (PIMA) o fibras de *G. hirsutum* (FM966) a las siguientes relaciones: 100% de PIMA, 75% de PIMA/25% de FM966, 50% de PIMA/50% de FM966, 25% de PIMA/75% de FM966, 100% de FM966. Los resultados se muestran esquemáticamente en la figura 7.

El eje X indica la presencia del alelo de Gluc1 de *G. hirsutum*, mientras que el eje Y indica la presencia del alelo de Gluc1 de *G. barbadense*. En el ADN aislado de fibras PIMA, sólo se detectó el alelo de Gluc1 de *G. barbadense*. En el ADN aislado de fibras PIMA, sólo se detectó el alelo de Gluc1 de *G. hirsutum*. En las muestras de ADN mixtas, el análisis Taqman permite la detección de las varias relaciones de ambos alelos.

En otro paso, el mismo tipo de análisis de RT-PCR se usó para analizar muestras de ácido nucleico del material de fibras y el material textil de algodón de una bala de FM966. Los resultados se muestran en la figura 8. En los ácidos nucleicos extraídos de la bala de FM966 y de las camisas polo, sólo se detectó el alelo de Gluc1 de *G. hirsutum*, indicando que el material de algodón usado se originó exclusivamente de material tipo *G. hirsutum*.

Aunque las pruebas pueden necesitar más optimización, dicha optimización está claramente dentro del alcance del experto en la técnica.

EJEMPLO 5

Caracterización del genoma de plastidios aislado de fibras de algodón

Debido al hallazgo inesperado de que el ADN genómico puede aislarse y caracterizarse de fibras de algodón maduras, se investigó la posibilidad de identificar el ADN de los plastidios en el grupo de ADN extraído de estas fibras.

Aunque se ha mostrado que los plastidios leucoplastos están
5 presentes en las fibras de algodón en desarrollo (Ryser U. (1985) *European Journal of Cell Biology* 39, pp. 236-256), no se espera que estén presentes en las fibras de algodón maduras. Los leucoplastos son similares a los cloroplastos porque tienen el mismo genoma – debido a que se diferencian del mismo tipo de células progenitoras –, pero los leucoplastos son especializados con alta
10 acumulación de contenido de almidón.

Cronn *et al* (2002) *American Journal of Botany* 89(4): 707-725 publicaron combinaciones de iniciadores para amplificar 4 genes del genoma de los plastidios (rpl16, matK, trnT-trnL y ndhF). En un primer paso, se optimizaron las combinaciones de iniciadores publicadas para la amplificación de estos 4
15 genes, llevando a cabo análisis por PCR en el ADN aislado de hojas de algodón. En un siguiente paso, la combinación de iniciadores optimizada por gen se usó para la amplificación en una muestra de ADN de fibras obtenida de una minibala de algodón (algodón FiberMax certificado). Se mostró sorprendentemente la amplificación de 4 fragmentos de PCR de esta muestra de ADN de las fibras. La
20 subclonación en vectores TOPO-blunt seguida del análisis de la secuencia de estos fragmentos, confirmó que estos cuatro fragmentos se originaron del genoma de los plastidios. Para rpl16, matK y trnT-trnL, la secuenciación resultó en una secuencia consenso única, y para ndhF se obtuvieron varias secuencias consenso.

Puesto que las secuencias completas de los cloroplastos de *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense* están disponibles en la base de datos de EMBL (la entrada DQ345959 es la secuencia de ADN de los cloroplastos de coker 310 FR (*G. hirsutum*), y la entrada AP009123 es la secuencia de ADN de los cloroplastos de *G. barbadense*), fue posible alinear las secuencias obtenidas con las secuencias publicadas. Se encontró que las secuencias obtenidas eran 100% idénticas a las secuencias publicadas de *G. hirsutum* (salvo por los sitios de los iniciadores degenerados). Esto confirma que la fibra en la bala de algodón se derivó de *G. hirsutum*. La caracterización molecular exitosa de estas secuencias específicas de los plastidios, provee ahora oportunidades novedosas para genotipificar el ADN de las fibras. Asimismo, muestras de fibras añejas pueden sondearse para secuencias de los plastidios, y su relación puede interpretarse durante la evolución y el mejoramiento genético.

15 Condiciones de la PCR:

2 µl de ADN molde

1.5 µl de iniciador delantero (10 µM)

1.5 µl de iniciador inverso (10 µM)

21 µl de agua MQ

20 1 µl de dNTP

10 µl de 10X regulador de pH HF

0.5 µl de Phusion

12.5 µl de agua MQ

25 Programa de la PCR:

- 30 segundos a 98°C
- 10 segundos a 98°C
- 30 segundos a 60°C
- 60 segundos a 72°C
- 5 35 ciclos
- 10 minutos a 72°C
- Mantener a 4°C.

Combinaciones de iniciadores:

- 10 rpl16 F71: gctatgcttagtgtgtgactcgtt (SEQ ID No 11)
R1516: cccttcattcttcctctatgttg (SEQ ID No 12)
- matK matKF3: ctaatggatcaacagaawcgtttg (SEQ ID No 13)
trnKR: aactagtcggatggagtag (SEQ ID No 14)
- trnT-trnL trnL2: aatattactgactccmtttkatttckag (SEQ ID No 15)
- 15 trnB: tctaccgatttcgcatatc (SEQ ID No 16)
- ndhF 5'Fnew: gaatatgcatggatcatacc (SEQ ID No 17)
1318R: cgaaacatatataaatgcrgttaatcc (SEQ ID No 18)

EJEMPLO 6

20 **Caracterización del genoma de los ácidos nucleicos aislados de las fibras de algodón**

Los ejemplos anteriores han mostrado convincentemente que ADN puede aislarse y caracterizarse de fibras de algodón maduras y de productos
25 corriente abajo de las mismas. En un siguiente paso, se cuestionó si el ADN

aislado de las fibras es una representación real del genoma entero del algodón, o si representa sólo una fracción del genoma del algodón. Un equivalente parcial del genoma no sería útil para la realización de pruebas de los rasgos o el genotipo, ya que generaría resultados de prueba no confiables e incompletos. El primer desafío

5 fue superar la cantidad limitada del ADN obtenido de las fibras de algodón como material de partida para la realización de las pruebas. Se eligió el método de la amplificación del genoma entero (WGA) para superar esta limitación. No se ha usado antes la WGA para amplificar un genoma poliploide tal como el algodón, para la genotipificación y la prueba de rasgos. Un paso de amplificación del ADN

10 es importante para aumentar la cantidad del material de partida de ADN de las fibras, pero es crítico no introducir una propensión del genoma, la cual es a veces inherente a un paso de WGA, como es reportado por Giardina *et al.* (2009) *BMC Genomics*, Abril 14, 10: 159. Se consignó la fiabilidad de un paso de WGA en el ADN aislado de las fibras, en una prueba Taqman funcional. Para esto, se

15 comparó la calidad del ADN de las fibras amplificado por WGA, con el ADN de los cotiledones amplificado por WGA de la misma fuente comercial de fibras de algodón en sustancialmente la misma prueba Taqman.

Aproximadamente 500 gramos de fibras FM9063B2F (muestras de 500 gramos, cada una en 3 pequeñas bolsas cafés; se tomaron 3 réplicas de

20 diferentes balas para la variedad de las muestras, bala no. 721134350138, 721134350154, 721134350156) fueron provistas por K. Merritt de una granja CropMark Direct. La fibra era de algodón cultivado en la estación de algodón 2008-9, y enlistada para el programa de certificación FiberMax.

Puesto que se había determinado que los contaminantes en las

25 fibras pueden tener un impacto significativo sobre el uso del ADN de las fibras

para la realización de pruebas corriente abajo, se limpiaron manualmente las fibras. Esto se hizo estirando una pequeña cantidad de fibras (por ejemplo, 1.5 gramos), por lo cual la mayor parte de los restos es removido con pinzas hasta que no puedan verse restos a simple vista. Se llevó a cabo la extracción del ADN

5 con el mini kit para plantas DNeasy® de Qiagen, con los siguientes pasos:

- Tomar 1 gramo de fibra de algodón madura depurada (sin desperdicio de hojas), y ponerlo en un tubo Falcon de 50 ml. Cortar las fibras unas cuantas veces con tijeras limpias.

- Añadir 5 ml de regulador de pH de lisis AP1 (Qiagen, No. de
10 catálogo 1014630) y 100 µl de ribonucleasa A (10 mg/ml). Usar un mortero para homogenizar el contacto entre la muestra y el regulador de pH.

- Incubar a 65°C por 20 minutos, usar un tubo de 15 ml para mezclar el material 2 a 3 veces durante la incubación.

- Usar un tubo de 15 ml para comprimir el material para transferir 500
15 µl de lisado en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se toman 3 alícuotas y se usan como duplicados.

- Añadir 130 µl de regulador de pH AP2, mezclar e incubar por 5 minutos en hielo para cada alícuota.

- Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.

- Transferir la fase líquida a la columna mini spin QIAshredder lila.
20

- Centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm.

- Transferir el flujo pasante a un nuevo tubo Eppendorf sin que se perturbe la pella.

- Añadir 800 µl de regulador de pH AP3/E y mezclar.

- Transferir 650 μ l a la columna mini spin DNeasy® y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, desechar el flujo pasante.
- Repetir este paso con la muestra restante. Desechar el tubo de colecta y poner la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml.
- 5 - Lavar la columna con 500 μ l de regulador de pH AW y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, desechar el flujo pasante.
- Lavar la columna con 500 μ l de regulador de pH AW y centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm, desechar el flujo pasante y el tubo de colecta.
- Poner la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sin sobrante de
- 10 etanol.
- Añadir 50 μ l de agua MQ a la columna e incubar por lo menos 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Almacenar el ADN a 4°C (corto plazo) o -20°C (largo plazo).
- 15 Se llevó a cabo la extracción del ADN de los cotiledones de FM9063 B2F, como sigue. Se hizo que germinaran 50 semillas de FM9063 B2F con papel de germinación y agua en una germinadora a 28°C. Se colectaron los cotiledones y se secaron con silicio. Se extrajo el ADN de los cotiledones. El ADN extraído de los cotiledones se combinó en cinco tubos de 1.5 ml.
- 20 Se llevó a cabo la amplificación del genoma entero con el kit de amplificación del genoma entero (WGA) completo GenomePlex® de Sigma, con los siguientes pasos:
- Añadir 1 μ l de 10x regulador de pH de fragmentación a 10 μ l de ADN extraído en un tubo de PCR.

- Incubar en un ciclizador térmico a 95°C por 2 minutos, y enfriar en hielo.
- Añadir 2 µl de 1x regulador de pH para la preparación de colecciones.
- 5 - Añadir 1 µl de solución para la estabilización de colecciones, y mezclar.
- Incubar en un ciclizador térmico a 95°C por 2 minutos, y enfriar en hielo.
- Añadir 1 µl de enzima para la preparación de colecciones, y
- 10 mezclar.
- Incubar en un ciclizador térmico usando WGA1 del programa.
 - 16°C por 20 minutos
 - 24°C por 20 minutos
 - 37°C por 20 minutos
 - 15 75°C por 5 minutos
 - 4°C siempre.
- Añadir la siguiente mezcla maestra:
 - 7.5 µl de 10x mezcla maestra para amplificación
 - 47.5 µl de agua libre de nucleasas
 - 20 5 µl de polimerasa para WGA
- Incubar en el ciclizador térmico usando WGA2 del programa
 - 95°C por 3 minutos
 - 14 ciclos de: 94°C por 15 segundos
 - 65°C por 5 minutos
 - 25 4°C siempre.

Poner 5 µl sobre un gel de agarosa a 1%, para verificar la calidad del ADN para WGA. Debe estar presente un frotis entre 100 y 1000 pb.

Todas las reacciones de WGA (fibras y cotiledones) demostraron ser exitosas.

5 Opcionalmente, el ADN amplificado por WGA de los cotiledones y las fibras de FM9063 B2F, se purificó adicionalmente de la siguiente manera. Se combina el ADN para WGA de 5 muestras en un tubo de 2 ml (aproximadamente 240 µl de ADN), se añaden 24 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y se mezclan, se añaden 800 µl de etanol a 100% enfriado en hielo y se mezclan completamente y
10 durante la noche a -20°C, se centrifugan a -20°C por 10 minutos a 12000 rpm, se remueve cuidadosamente el sobrenadante, se lava la pella de ADN con 800 µl de etanol a 70% enfriado en hielo, se centrifugan a -20°C por 2 minutos a 12000 rpm, se remueve cuidadosamente el sobrenadante, se pone el tubo en una incubadora a 65°C por 15 minutos hasta secarse, y se resuspende el ADN en 65 µl de 1x
15 regulador de pH TE.

Dos diferentes pruebas Taqman se llevaron a cabo en las muestras de ADN amplificado: una prueba Taqman dirigida a identificar 40 diferentes SNPs, y otra prueba Taqman dirigida a identificar 3 rasgos diferentes: Bollgard II (Mon531), Bollgard (MON15985) y Flex (MON 88913). Cada una de estas pruebas
20 Taqman se llevó a cabo en 4 diferentes muestras de ADN: 1) ADN amplificado por WGA extraído de fibras de FM9063 B2F, 2) ADN amplificado por WGA extraído de los cotiledones de FM9063 B2F, 3) ADN purificado amplificado por WGA de fibras de FM9063 B2F, y 4) ADN purificado amplificado por WGA de cotiledones de FM9063 B2F. Debido a que se sabe que el subgenoma A del algodón (At) es 50%

más grande que el subgenoma D del algodón (Dt) en tamaño físico, se seleccionaron 23 SNPs del genoma A, y 17 se seleccionaron del genoma D.

Se observó que todos los 40 SNPs pudieron detectarse exitosamente en la prueba Taqman en el ADN de las fibras purificado amplificado por WGA de FM9063 B2F. Además, un resultado idéntico para la detección de los mismos 40 SNPs se obtuvo con el ADN de los cotiledones purificado amplificado por WGA de FM9063 B2F y con el ADN de los cotiledones de FM9063 B2F en bruto (es decir, no purificado). La prueba Taqman para la detección de Bollgard II (Mon531), Bollgard (MON15985) y Flex (MON 88913) demostró también que da resultados idénticos entre las muestras de ADN amplificado por WGA de las fibras y cotiledones. Se puso a prueba Mon531 de acuerdo con Yang *et al.* (2005) *J. Agric. Food Chem.* 53, 6222-6229. Mon15985 y Mon88913 se pusieron a prueba de acuerdo con Lee *et al.* (2007) *J. Agric. Food Chem.* 55, 3351-3357.

De esta manera, puede usarse el ADN de las fibras de algodón amplificado por WGA como una fuente confiable para la determinación exitosa de marcadores moleculares, puesto que demostró resultados idénticos a los de una prueba Taqman llevada a cabo en el ADN de las hojas amplificado por WGA. Además, el ADN de las fibras de algodón amplificado por WGA puede usarse como una fuente confiable para la determinación exitosa de los rasgos, puesto que demostró los mismos resultados que una prueba Taqman llevada a cabo en el ADN de las hojas amplificado por WGA. Aunque usualmente un mayor número de SNPs (aproximadamente 300) debe usarse para la caracterización e identificación de una variedad de algodón específica, el presente ejemplo muestra que este procedimiento es posible usando el ADN de las fibras de algodón amplificado por WGA.

EJEMPLO 7**Otras macromoléculas biológicas aisladas del material de fibras de algodón**

La espectrofotometría UV de los extractos usando los diferentes
5 protocolos para el aislamiento indica que estos extractos no consisten puramente
de ADN, y pueden contener otras macromoléculas biológicas. Mediante el uso de
un análisis de Bradford, se encontró una baja concentración de proteínas
(aproximadamente 10 ng/ μ l). Además, los extractos de fibras contenían varias
concentraciones de pequeñas moléculas de ARN, resistentes a la ribonucleasa I,
10 las cuales se identificaron como micro ARNs.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método para caracterizar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, que comprende los pasos de: a. aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal diferente de polisacáridos o lignina; y b. caracterizar la información codificada en la secuencia de los monómeros de dicha macromolécula biológica.

10 2.- Un método para identificar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, que comprende los pasos de: a. aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal diferente de polisacáridos o lignina; y b. someter dicha macromolécula biológica a una prueba de detección específica para dicha fibra vegetal.

15 3.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque dicha fibra vegetal es una fibra de semilla.

 4.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque dicha fibra vegetal es una fibra de algodón.

 5.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado además porque dicha macromolécula biológica se selecciona del grupo de polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, ADN, ARN, ARN de cadena sencilla y ARN de doble cadena.

 6.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de
25 detección basada en reacción en cadena de polimerasa.

7.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección basada en anticuerpos.

8.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección basada en hibridación de ácidos nucleicos.

9.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque dicha prueba de detección detecta la presencia o ausencia de genes quiméricos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque dicho gen quimérico comprende una región codificante o parte de una porción antisentido de la misma seleccionada de N-acetilglucosamina transferasa, fosfinotricinacetiltransferasa, EPSPS, hidroxifenilpiruvatodioxigenasa, una porción insecticida de proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis*, poli(ADP-ribosa) polimerasa, poli(ADP-ribosa) glucohidrolasa, sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, glucanasa, celulosa sintasa, quitinasa, expansina, calosa sintasa, cinasa, nicotinamidasas, nicotinato fosforribosiltransferasa, ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa, nicotinamida adenín dinucleótido sintetasa o nicotinamida fosforribosiltransferasa.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección específica de evento.

12.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque dicha prueba de detección detecta la

presencia o ausencia de alelos específicos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras.

13.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, caracterizado además porque dicha fibra está presente en hilos, tela, tela
5 con hilos metálicos o indumentaria acabada.

14.- Un método para analizar el genoma de una planta que produce fibras, que comprende los pasos de: a. aislar ácidos nucleicos de las fibras maduras o procesadas de dicha planta, dichos ácidos nucleicos siendo de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal; y b. someter dicho ácido nucleico a un
10 protocolo de análisis del genoma.

15.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque dicho ácido nucleico se selecciona del grupo de ADN, ARN, ARN de cadena sencilla y ARN de doble cadena.

16.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado
15 además porque dicho ácido nucleico es ADN.

17.- El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado además porque dicho ADN aislado es sometido a un paso de amplificación del genoma entero antes de que se someta dicho ácido nucleico a un protocolo de análisis del genoma.

20 18.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado además porque dicho método se aplica a fibras maduras añejas, o hilos añejos, telas o indumentaria acabada.

19.- Un método para aislar un ácido nucleico de fibras vegetales maduras o fibras vegetales procesadas, que comprende los pasos de: a. remover
25 el material de desperdicio del tallo y de la hoja de las fibras vegetales maduras

cosechadas; y b. incubar dichas fibras vegetales en un regulador de pH de lisis que contiene detergentes, proteasas y sales por un tiempo prolongado, de preferencia por un período de 4 a 100 horas; y c. procesar dicho regulador de pH de lisis de acuerdo con métodos estándar de aislamiento de ácido nucleicos, y
5 aislar dicho ADN.

20.- El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado además porque dicho ácido nucleico es ADN.

21.- Un método para aislar un ácido nucleico de tela tejida o tricotada, que comprende los pasos de: a. destejer los hilos de dicha tela; b.
10 incubar dichos hilos en un regulador de pH de lisis que contiene detergentes, proteasas y sales por un tiempo prolongado, de preferencia por un período de 4 a 100 horas; y c. procesar dicho regulador de pH de lisis de acuerdo con métodos estándar de aislamiento de ácido nucleicos, y aislar dicho ácido nucleico.

22.- El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado
15 además porque dicho ácido nucleico es ADN.

23.- El uso de un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en un procedimiento para certificar la identidad de fibras vegetales comercializadas.

24.- Un método para determinar las cantidades relativas de
20 diferentes fibras vegetales en una mezcla de fibras vegetales maduras o procesadas, que comprende los pasos de: a. aislar de dicha mezcla de fibras vegetales una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dichas fibras vegetales diferentes de polisacáridos o lignina; b. someter dicha macromolécula biológica a pruebas de detección específicas para cada una de dichas fibras
25 vegetales; y c. determinar la cantidad relativa de cada una de las fibras.

25.- Un método para certificar la identidad de fibras de algodón comercializadas, dicho método comprendiendo: a. registrar la compra de semillas de algodón certificadas por agricultores registrados, dicha semilla de algodón comprendiendo una composición específica del genoma y produciendo una marca particular de fibras de algodón; b. registrar balas de fibras de algodón en bruto producidas por dichos agricultores registrados de dichas semillas de algodón certificadas como dicha marca particular de fibras de algodón; c. autenticar dichas balas por verificación cruzada con dichos registros de compra de la semilla; d. proveer dichas balas registradas a molinos para producir hilos, telas o indumentaria de dicha marca de fibras de algodón, de preferencia predominantemente, en particular exclusivamente de dicha marca de fibras de algodón; y e. auditar la identidad de dicha marca de fibras de algodón en uno o más pasos usando un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proveen métodos para el aislamiento de macromoléculas biológicas que incluyen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos de fibras vegetales
5 maduras tales como fibras de algodón y de textiles; las macromoléculas biológicas pueden usarse para caracterizar la fibra vegetal (fuente, origen, composición genómica de la planta productora, etc.).

10

15

20

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Solicitante: BAYER BIOSCIENCE N.V.
ARIOLI, Tony
ENGELLEN, Steven

<120> Título de la invención: Métodos para la caracterización e identificación de fibras vegetales

10 <130> Número de referencia: BCS 08-2011

<160> Números de secuencias: 18

15 <170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

20 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de Ghgluc1

25 <400> Secuencia: 1
ggccgaagcc gatcttatct agg 23

30 <210> SEQ ID NO: 2
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

35 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de Ghgluc1

40 <400> Secuencia: 2
cggcaacaat cttccatctc cag 23

45 <210> SEQ ID NO: 3
<211> Longitud: 55
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

50 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de NodC

<400> Secuencia: 3
cgtttttcac tcatcgtcgt tttcaagtgt cgtagatgtg atcggtttgc ttgcg 55

55 <210> SEQ ID NO: 4
<211> Longitud: 33
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

60 <220> Característica:

<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de NodC

5 <400> Secuencia: 4
ggcgcgcctt aggaactctc gcgtgatagc cac 33

10 <210> SEQ ID NO: 5
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

15 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de expansina

20 <400> Secuencia: 5
gggagcttgt gggtatggaa acc 23

25 <210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 25
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

30 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de expansina

35 <400> Secuencia: 6
cagggacgat cccagctcga tatte 25

40 <210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 25
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

45 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para prueba de detección Taqman de GhGluc1 (iniciador delantero)

50 <400> Secuencia: 7
gcttttggaa gcgatataac atcga 25

55 <210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 25
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

60 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para prueba de detección Taqman de GhGluc1 (iniciador inverso)

65 <400> Secuencia: 8
ggcataggca aaataagggt acaca 25

70 <210> SEQ ID NO: 9

<211> Longitud: 16
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 3 para prueba de detección
Taqman de GhGluc1 (oligonucleótido marcado con VIC que detecta el alelo
G. hirsutum de Gluc1)

10 <400> Secuencia: 9
aatcctgtcg aaccag 16

15 <210> SEQ ID NO: 10
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

20 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 4 para prueba de detección
Taqman de GhGluc1 (oligonucleótido marcado con FAM que detecta el alelo
G. barbadense de Gluc1)

25 <400> Secuencia: 10
atcctgtcaa accag 15

30 <210> SEQ ID NO: 11
<211> Longitud: 24
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

35 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de
rpl16

<400> Secuencia: 11
gctatgctta gtgtgtgact cggt 24

40 <210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

45 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de
rpl16

50 <400> Secuencia: 12
cccttcattc ttcctctatg ttg 23

55 <210> SEQ ID NO: 13
<211> Longitud: 24
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de
matK

5 <400> Secuencia: 13
ctaattgatc aacagaawcg ttgtg 24

10 <210> SEQ ID NO: 14
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

15 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de
matK

20 <400> Secuencia: 14
aactagtcgg atggagtag 19

25 <210> SEQ ID NO: 15
<211> Longitud: 30
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

30 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de
trnT-trnL

35 <400> Secuencia: 15
aatattactg actccmtttt kattttckag 30

40 <210> SEQ ID NO: 16
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

45 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de
trnT-trnL

50 <400> Secuencia: 16
tctaccgatt tcgcatatc 20

55 <210> SEQ ID NO: 17
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

60 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 1 para amplificación por PCR de
ndhF

65 <400> Secuencia: 17
gaatatgcat ggatcatacc 20

70 <210> SEQ ID NO: 18

<211> Longitud: 26
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra Información: oligonucleótido 2 para amplificación por PCR de
ndhF

10 <400> Secuencia: 18
cgaaacatat aaaatgcrgt taatcc 26

FIGURAS

FIGURA 7:

Allele: Alelo

5 Allelic Discrimination: Discriminación alélica

Legend: Leyenda

Both: Ambos

Undetermined: No determinado

10 FIGURA 8:

Allele: Alelo

Allelic Discrimination: Discriminación alélica

Legend: Leyenda

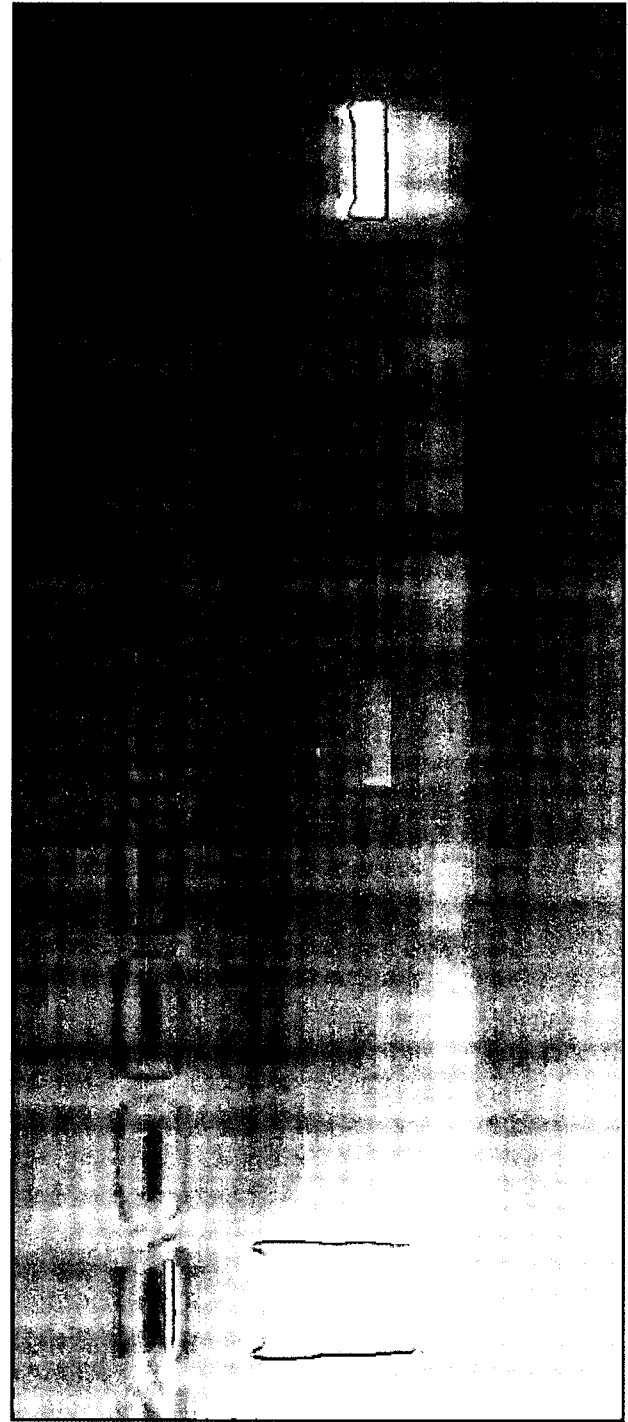
Both: Ambos

15 Undetermined: No determinado

Bale: Bala de algodón

Figure 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1/8

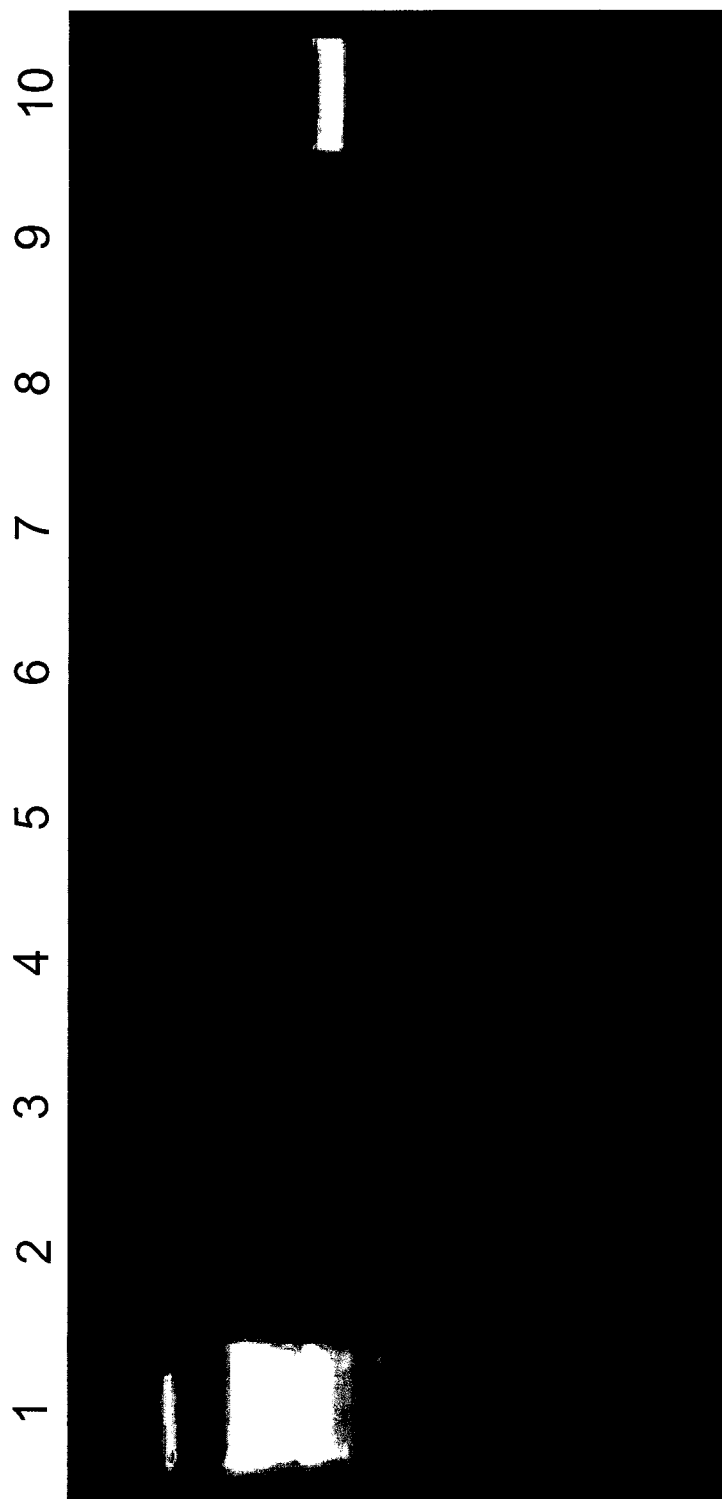


Figure 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

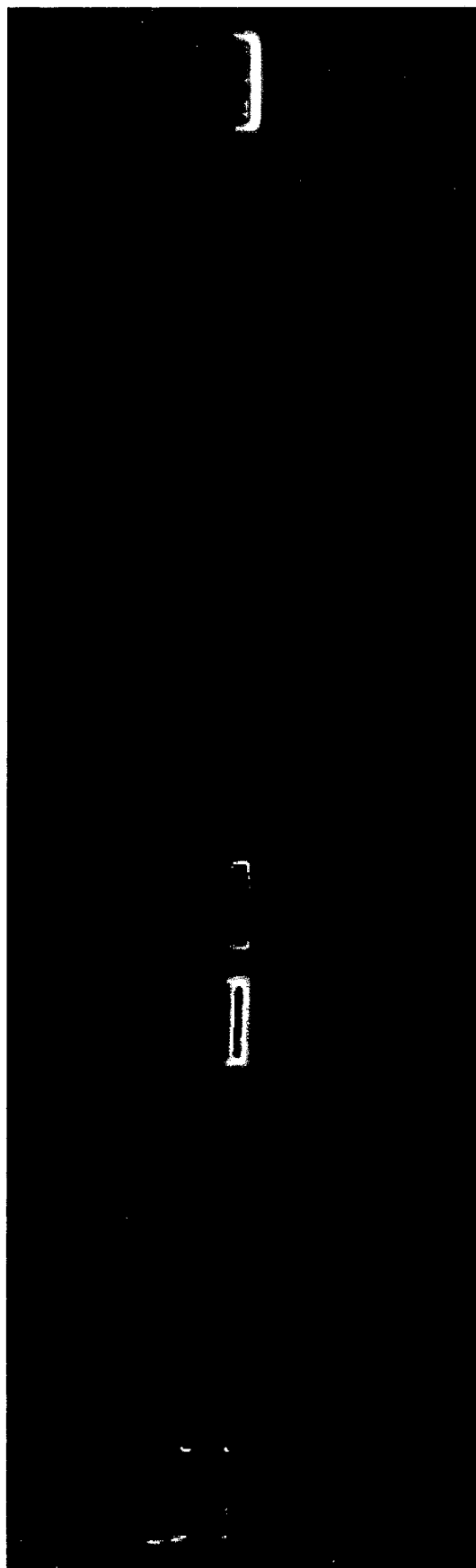


Figure 3

1 2 3 4 5 6 7 8

4/8

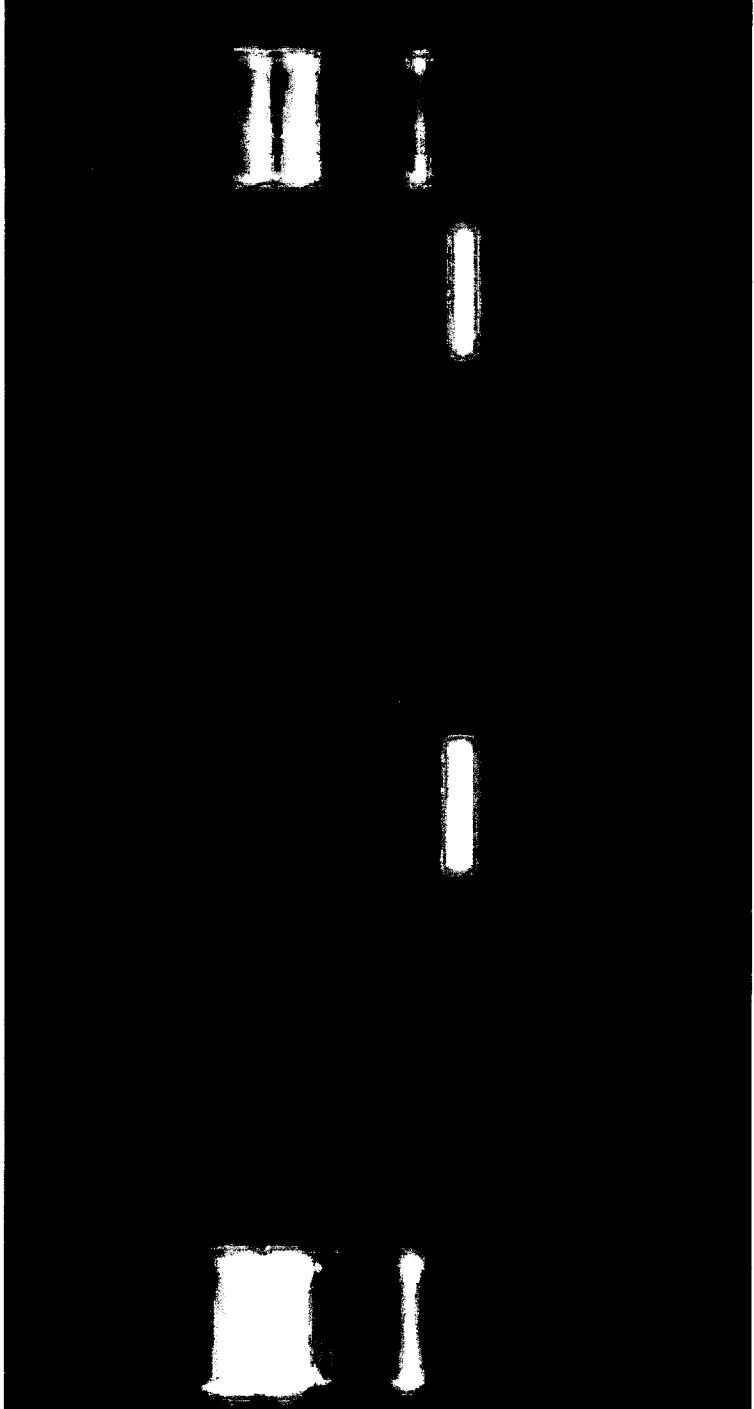


Figure 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

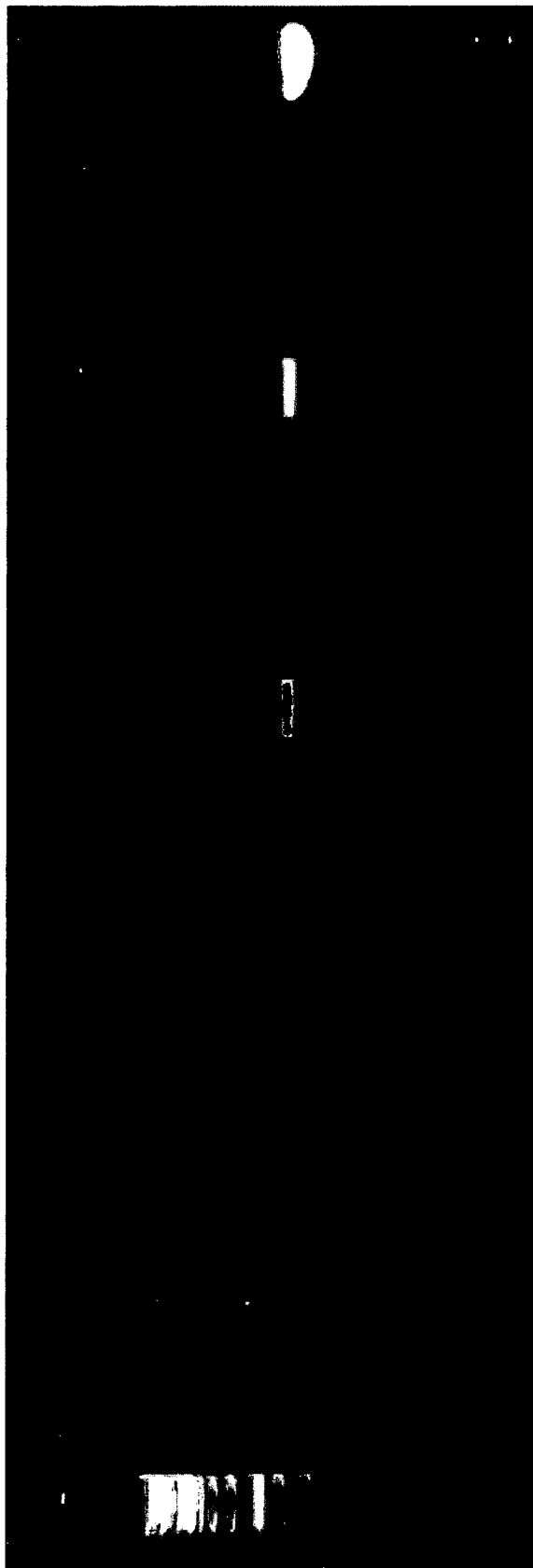
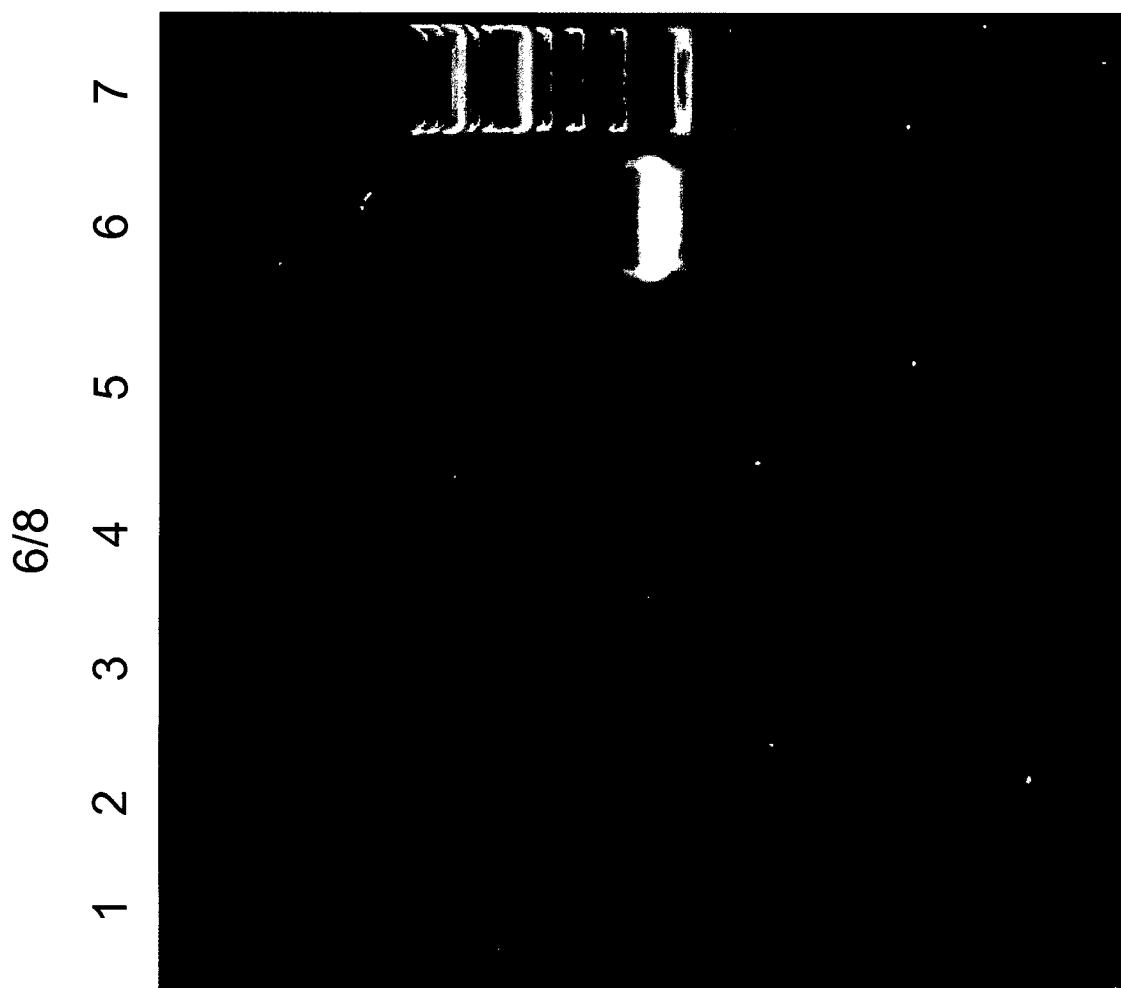


Figure 5

5/8

Figure 6



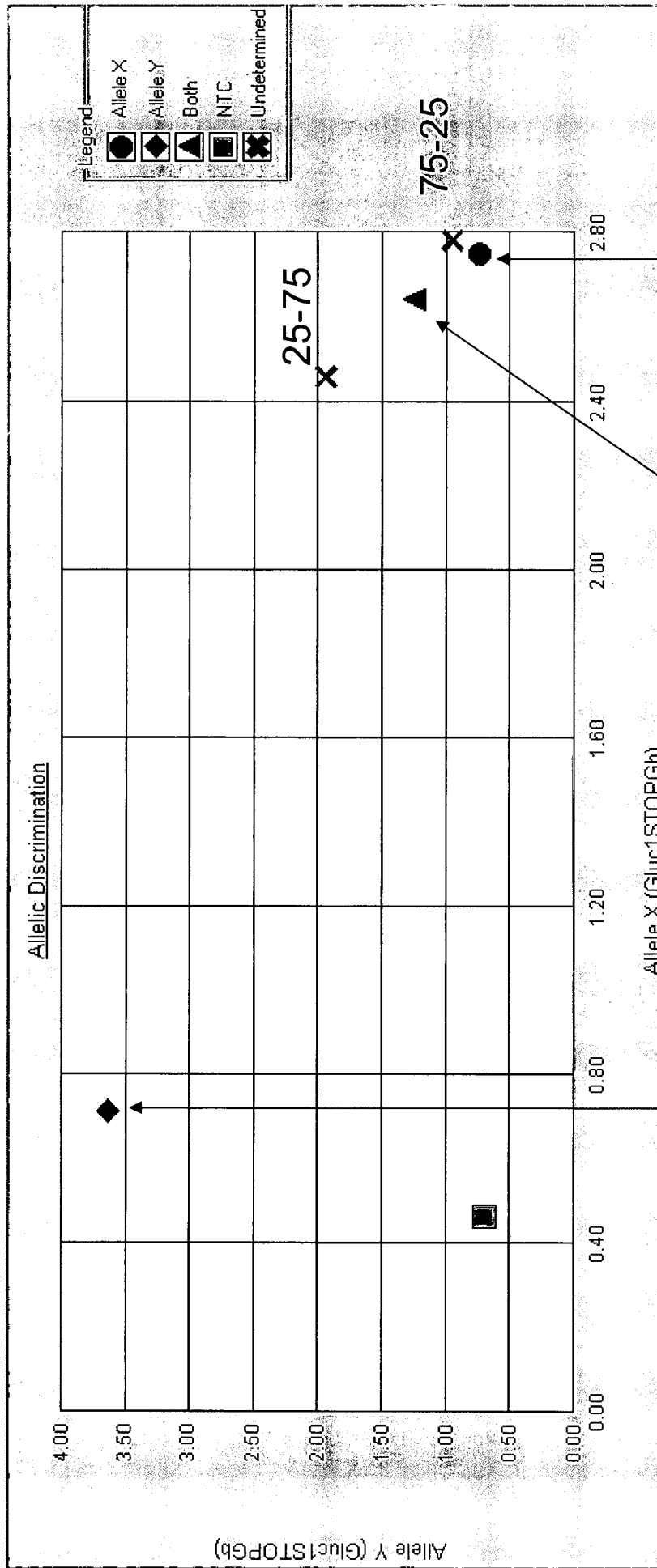


Figure 7

Pima

FM966-Pima (50-50)

FM966

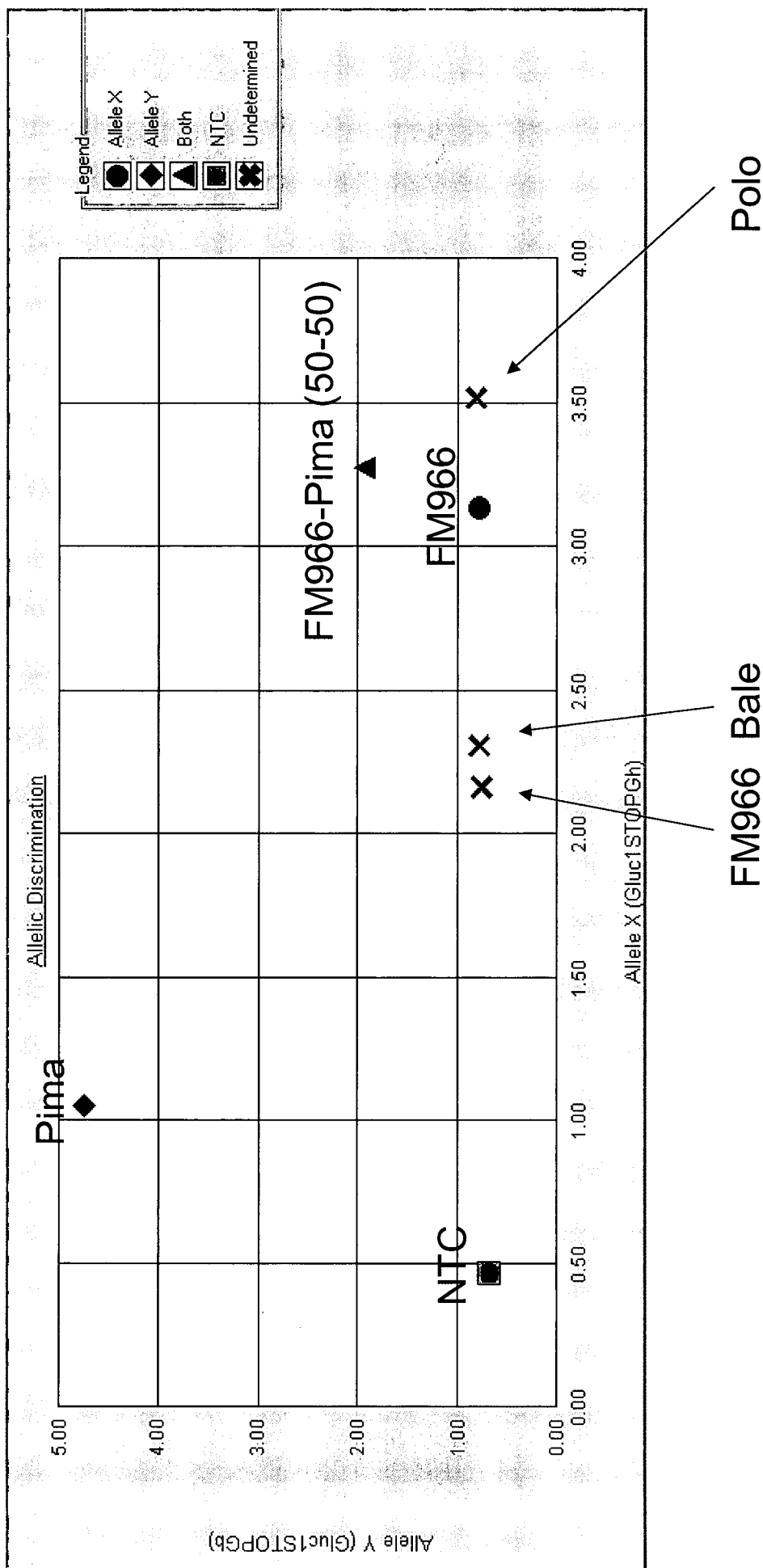


Figure 8

000131



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) **ANTONIO ARIOLI, STEVEN ENGELEN**

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

(30) Prioridad	(31) N° Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	08014211.0	08/08/2008	EP
	61/188.613	11/08/2008	US

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

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

Fecha: **11/02/2010**

Fecha de presentación de la solicitud: **06/08/2009**

N° publicación: **WO 2010/015423 A2**

N° de solicitud **PCT/EP2009/005891**

(54) Título: **METODOS PARA LA CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE FIBRAS VEGETALES**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad 31) N° Prioridad (32) Fecha (33) Pais 08014211.0 08/08/2008 EP 61/188.613 11/08/2008 US		(51) Int. Cl.: (71) Solicitante(s) BAYER BIOSCIENCE N.V. (72) Inventor(es) ANTONIO ARIOLI STEVEN ENGELEN (74) Apoderado: DR. LUIS PATIÑO LEYVA	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06/08/2009 N° de solicitud PCT/EP2009/005891		(87) Publicación internacional Fecha: 11/02/2010 N° publicación: WO 2010/015423 A2	
(54) Título: METODOS PARA LA CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE FIBRAS VEGETALES			

Reivindicación(es):

1. Un método para caracterizar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, que comprende los pasos de: a. aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal diferente de polisacáridos o lignina; y b. caracterizar la información codificada en la secuencia de los monómeros de dicha macromolécula biológica.

2.- Un método para identificar una fibra vegetal madura o una fibra vegetal procesada, que comprende los pasos de: a. aislar de dicha fibra vegetal una macromolécula biológica de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal diferente de polisacáridos o lignina; y b. someter dicha macromolécula biológica a una prueba de detección específica para dicha fibra vegetal.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque dicha fibra vegetal es una fibra de semilla.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque dicha fibra vegetal es una fibra de algodón.

5.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado además porque dicha macromolécula biológica se selecciona del grupo de polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, ADN, ARN, ARN de cadena sencilla y ARN de doble cadena.

6.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección basada en reacción en cadena de polimerasa.

7.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección basada en anticuerpos.

8.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección basada en hibridación de ácidos nucleicos.

9.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque dicha prueba de detección detecta la presencia o ausencia de genes

quiméricos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque dicho gen quimérico comprende una región codificante o parte de una porción antisentido de la misma seleccionada de N-acetilglucosamina transferasa, fosfinotricinacetiltransferasa, EPSPS, hidroxifenilpiruvatodioxigenasa, una porción insecticida de proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis*, poli(ADP-ribosa) polimerasa, poli(ADP-ribosa) glucosidolasa, sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, glucanasa, celulosa sintasa, quitinasa, expansina, calosa sintasa, cinasa, nicotinamidas, nicotinato fosforibosiltransferasa, ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa, nicotinamida adenil dinucleótido sintetasa o nicotinamida fosforibosiltransferasa.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque dicha prueba de detección es una prueba de detección específica de evento.

12.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizado además porque dicha prueba de detección detecta la presencia o ausencia de alelos específicos presentes en el genoma de la planta que produce las fibras.

13.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, caracterizado además porque dicha fibra está presente en hilos, tela, tela con hilos metálicos o indumentaria acabada.

14.- Un método para analizar el genoma de una planta que produce fibras, que comprende los pasos de: a. aislar ácidos nucleicos de las fibras maduras o procesadas de dicha planta, dichos ácidos nucleicos siendo de ocurrencia natural en dicha fibra vegetal; y b. someter dicho ácido nucleico a un protocolo de análisis del genoma.

15.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque dicho ácido nucleico se selecciona del grupo de ADN, ARN, ARN de cadena sencilla y ARN de doble cadena.

16.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque dicho ácido nucleico es ADN.

...

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 11-025439- -00000-0000 Fecha: 2011-03-02 14:33:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII -Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 132 ES	
PATENTE DE INVENCIÓN ☐		MODELO DE UTILIDAD ☐ Art. 33 Decisión 486/00	
☐	Indicación que se solicita una patente		
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☐	Descripción de la invención		
☐	Dibujos de ser estos pertinentes		
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)		
Completa ☐		Incompleta ☐	
PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐		MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art. 33 Decisión 486/00 Circular Única	
☒	Indicación que se solicita una PCT		
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)		
☒	Dibujos de ser estos pertinentes		
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)		
Completa ☒		Incompleta ☐	
DISEÑO INDUSTRIAL ☐		(Art. 119 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita 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 ☐	
ESQUEMA DE TRAZADO ☐		(Art. 92 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado		
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado		
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas		
Completa ☐		Incompleta ☐	

Small, dark, irregularly shaped object, possibly a seed or a small insect, resting on a light-colored surface.



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
PATIÑO LEYVA LUIS
Apoderado(a) y/o Representante de
BAYER BIOSCIENCE N.V.

REFERENCIA	Radicación No.	11 025439
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/005891
	Fecha inicio fase nacional	08/03/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	05821

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.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 11 025439

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

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

01 ABR. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11