

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-039002- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:08:35

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 75

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ DETECCION DEL EVENTO DAS-40278-9 DE AAD-1

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO _____ INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-039002- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **DOW AGROSCIENCES LLC**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 9330 Zionsville Road,
Indianapolis,
Indiana 46268,
Estados Unidos de América

Domicilio: Indianapolis,
Indiana,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

35.456.344

T.P

23.555

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. Yunxing Cory CUI

13736 Royal Saddle Drive,
Carmel,
Indiana 46032,
Estados Unidos de América
2. Thomas William GREENE

4668 St. John Circle,
Zionsville,
Indiana 46077,
Estados Unidos de América
3. Stephen NOVAK

509 Viburnum Run,
Westfield,
Indiana 46074,
Estados Unidos de América
4. Ning ZHOU

4776 Pebblepointe Pass,
Zionsville,
Indiana 46077,
Estados Unidos de América

5
PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/045871 Fecha: 18 de agosto de 2010
Publicación Internacional No. WO 2011/022471 A1 Fecha: 24 de febrero de 2011

6

Título (54)

DETECCIÓN DEL EVENTO DAS-40278-9 DE AAD-1

7

Clasificación Internacional (51) C12Q 001/68

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

19 de agosto de 2009
23 de abril 2010

(31) Número de Solicitud

61/235,248
61/237,366

9	Comprobante de pago No.: <u>12-0016618</u>	Fecha: <u>20 de febrero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0013869</u>	Fecha: <u>13 de febrero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0016547</u>	Fecha: <u>20 de febrero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0016548</u>	Fecha: <u>20 de febrero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-006214</u>	Fecha: <u>23 de enero de 2012</u>

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 13 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$390.000.oo.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poder de **DOW AGROSCIENCES LLC**

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☐

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011022/471 A1.

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar 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

☐

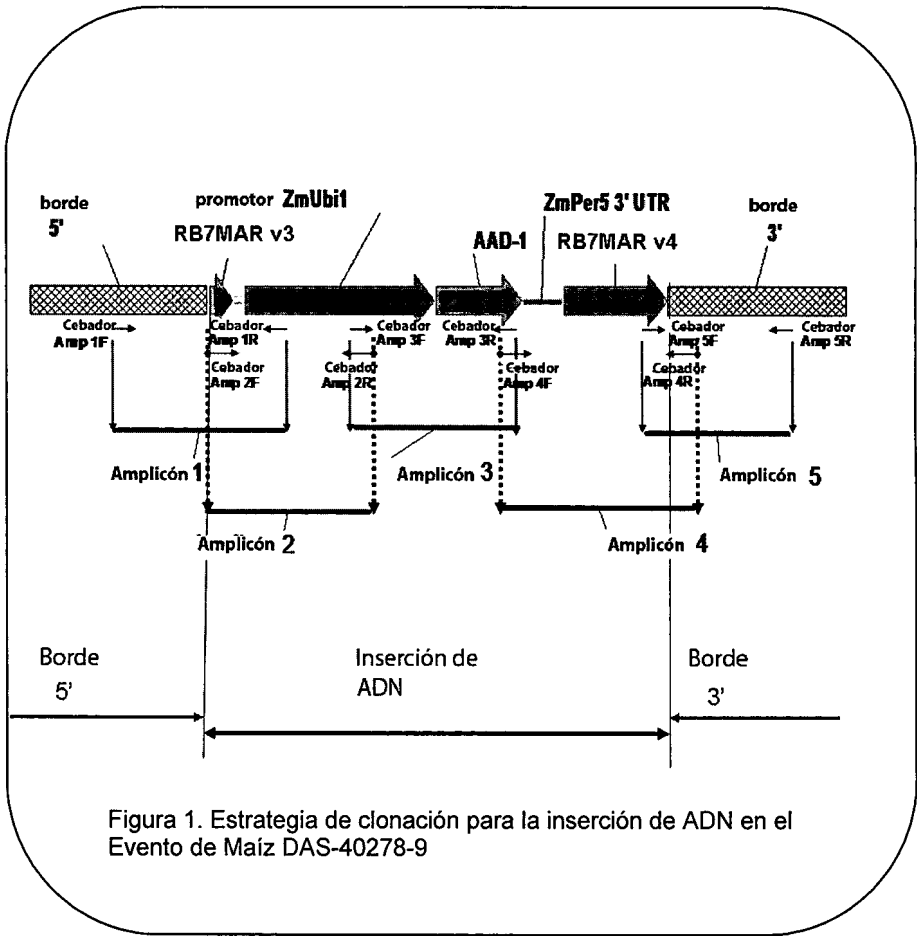
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia Soler Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/022471 A1

Descripción:

Páginas 42 en español

Reivindicaciones: Número (s) 23

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

Dow AgroSciences LLC

of / domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,

Indianapolis, Indiana 46268, United

States of America,

por el presente ratificamos la

presentada por

como agente oficioso ante

en

el

y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the

filed without a Power of Attorney by

before

in

on

and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we authorize the above-named attorneys to obtain the protection of my (our) industrial property against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before all authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters governing the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

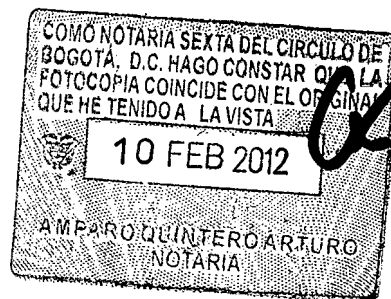
February 6, 1978

In/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher
Signature _____ Firma _____

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel





Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

TEL. (312) 923-1196 FAX (312) 923-1197

No. 254

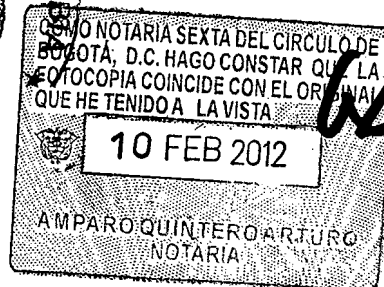
Chicago, FEB 20 1998

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA, que el señor (a) MARY REEVER, quien como SECRETARIA DELEGADA ESTADO, IN., autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que la compañía DOW AGROSCIENCES LLC es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de DELAWARE y cumple su objeto conforme a las mismas; que el (a) señor (a) KENNETH L. WERTSCHER, quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL de la citada compañía confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US\$56.00 (Cincuenta y seis dólares)


CARLOS ALFONSO NEGRETE
Cónsul General



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Carlos
221220
Regist

OFICINA GENERAL EN EL
MINISTERIO DE EMPENA
FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 A 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Bernarda R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

10 FEB 2012

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

SF 20

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That,
according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected
or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County
and that the term of said office included the date of February 6, 1998: that to all his/her official acts as said offi-



cial, full faith and credit ought to be given in all Courts of
Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto
set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana,
at Indianapolis, this Tenth day of
February, 1998

Sue Anne Gilroy
Secretary of State

by: Mary Beaver
Deputy

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
10 FEB 2012
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98
ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA
compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98
compareció(eron) ante mí
KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen
to en representación de la Sociedad/compañía
denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1997
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware,
Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, Estados Unidos de America.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER
SECRETARIO ASISTENTE y ASESOR LEGAL PATENTES

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98
before me, a Notary Public of State of Indiana.
personally appeared Kenneth L. Loertscher

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the ~~Corporation/Company~~ Limited
named Dow AgroSciences LLC Liability
Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1997
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC

Limited Liability
is a ~~Corporation/Company~~ Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

Limited Liability
2.2. That the domicile of said ~~Corporation/Company~~ Company is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, United States of America.

2.3. That the purpose or purposes of which the present Power
of Attorney is granted are ~~comprehended~~ within the corporation
purposes of ~~the corporation~~ the mentioned
~~the mentioned corporation~~ the mentioned liability company.

2.4. That ~~Mr. Messrs.~~ Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel
is(are) authorized to ~~grant~~ exercise the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

Lydia S. Owens
Notary Public, State of Indiana
Hendricks County
My Commission Expires 03/05/00

* Documents must be identified with date and origin.

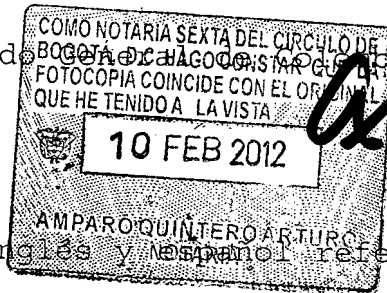
10

TRADUCCION OFICIAL No.03.075.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual Dow AgroSciences LLC, otorga Poder a favor de GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.)

Dado y firmado hoy 6 de febrero de 1998, en Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., por Kenneth L. Loertscher, Subsecretario y Asesor General de Patentes.

(Sellos parciales en tinta del Consulado de Colombia en Chicago.)



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO), en inglés y español referente a la capacidad legal que tenía KENNETH L. LOERTSCHER para otorgar el documento antes mencionado, expedido el 6 de febrero de 1998 en el Estado de Indiana.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD), en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad Dow AgroSciences LLC, expedido en la Ciudad de Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., el 6 de febrero de 1998.

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público

(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00

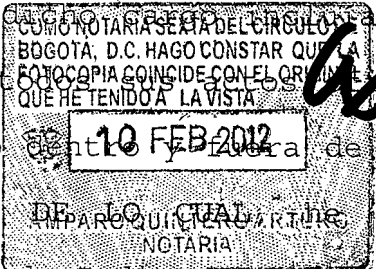
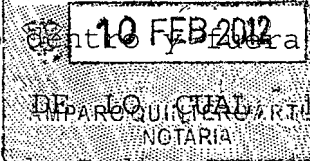
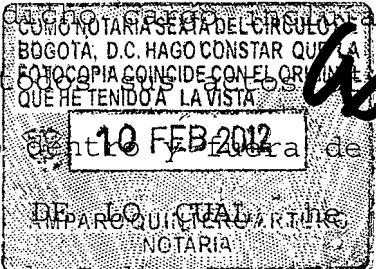
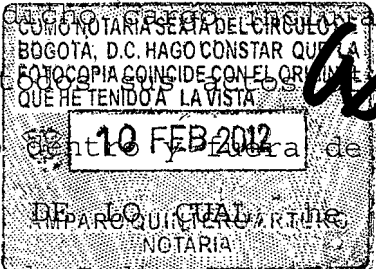
(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en
Chicago.)

ESTADO UNIDOS DE AMERICA

CERTIFICADO DEL CARGO

ESTADO DE INDIANA

Yo, SUE ANN GILROY, Secretario de Estado de Indiana, POR EL
PRESENTE CERTIFICO: que, de acuerdo con los archivos que obran
en mi oficina, LYDIA S. OWENS fue debidamente elegido y
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de  la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a  oficiales se
les debe dar completa fe y crédito  de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO  firmado y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana, en Indianápolis,
hoy 10 de febrero de 1998.

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

Secretario de Estado

(Firmado),

Por: Mary Reeve

Suplente

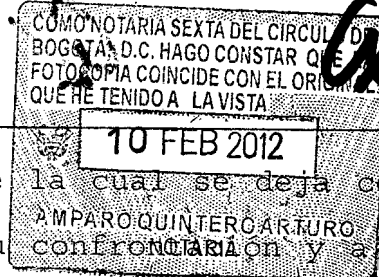
(Adherido se encuentra sello de oblea dorado con texto en
relieve), SELLO DEL ESTADO DE INDIANA 1816

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(En español), Certificación de la firma y cargo de MARY REEVER, de la existencia legal de la compañía DOW AGROSCIENCES LLC y de la autoridad que tenía su representante Legal, KENNETH L. LOERTSCHER, para otorgar el poder mencionado arriba. Esta certificación fue expedida por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el N° 254, de fecha 20 de febrero de 1998 y firmada por Carlos Alfonso Negret Mosquera, Cónsul General. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 221220, de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

Bernarda R. de Martínez

Traductora e Interprete Oficial

Resolución 683 Minjusticia 1991

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

022686

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

10 FEB 2012

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLEO
LAS FUNCIONES INDICADAS

13

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

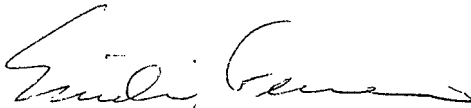
E. S. D.

Poderdante : DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el : 06/02/1998

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparado(non) *Emilio Ferrero*
Williamson y Luz Clemencia
Gómez de Páez
 Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.
 CC 438019 TP 31929
 CC 35456344 TP 23555
 y declaró(aron) que la(s) firma(s) que se reco(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemencia Gómez de Páez



COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE
 FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
10 FEB 2012
 AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 February 2011 (24.02.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/022471 A1

- (51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/045871
- (22) International Filing Date:
18 August 2010 (18.08.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/235,248 19 August 2009 (19.08.2009) US
61/237,366 23 April 2010 (23.04.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **DOW AGROSCIENCES LLC** [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **CUI, Yunxing, Cory** [US/US]; 13736 Royal Saddle Drive, Carmel, IN 46032 (US). **GREENE, Thomas, William** [US/US]; 4668 St. John Circle, Zionsville, IN 46077 (US). **NO-VAK, Stephen** [US/US]; 509 Viburnum Run, Westfield, IN 46074 (US). **ZHOU, Ning** [CA/US]; 4776 Pebblepointe Pass, Zionsville, IN 46077 (US).
- (74) Agent: **SANDERS, Jay, M.**; Baker & Daniels LLP, 300 North Meridian Street, Suite 2700, Indianapolis, IN 46204 (US).
- (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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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).
- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2011/022471 A1

(54) Title: DETECTION OF AAD-1 EVENT DAS-40278-9

(57) Abstract: This invention relates in part to detecting herbicide tolerant plants - more specifically, an aad-1 transformation event in corn plants. The subject invention also provides assays for detecting the presence of the subject event in a sample (of corn grain, for example). Kits and conditions useful in conducting the assays are also provided. The subject invention also relates in part to plant breeding using the subject methods. In some embodiments, said event / polynucleotide sequence can be "stacked" with other traits. More specifically, the invention relates in part to an endpoint TaqMan PCR assay for AAD-1 corn event 40278-9. Some embodiments are directed to assays that are capable of high throughput zygosity analysis. The subject invention further relates, in part, to the use of a preferred reference gene for use in determining zygosity.

DETECCIÓN DEL EVENTO DAS-40278-9 DE AAD-1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El gen *aad-1* (originalmente de *Sphingobium herbicidovorans*) codifica la
5 proteína ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1). El rasgo confiere tolerancia a
herbicidas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ariloxifenoxipropionato
(comúnmente denominados herbicidas "fop", tales como diclofop y quizalofop), y
puede usarse como un marcador de selección durante la transformación de
plantas y en viveros de cultivo. El gen *aad-1*, en sí mismo, fue descrito por
10 primera vez para la tolerancia a herbicidas en plantas en el documento WO
2005/107437 (ver, además, US 2009-0093366).

Se conocen diversos métodos de detección de eventos. Sin embargo, cada
uno de ellos tiene cuestiones. Un método consiste en la técnica de
pirosecuenciamiento, descrita por Winge (*Innov. Pharma. Tech.*, 00: 18-24,
15 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone con el
ADN genómico adyacente y la unión de ADN de inserción. El oligonucleótido es
hibridado a un producto de PCR de hebra simple desde la región de interés (un
cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y
es incubado en presencia de una polimerasa de ADN, ATP, sulfurilasa, luciferasa,
20 apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se agregan DNTP
(desoxinucleótidos trifosfatos) individualmente, y la incorporación logra una señal
leve, que es medida. Una señal débil indica la presencia de la inserción de
transgén/secuencia flanqueante, debido a la exitosa amplificación, hibridación y
extensión de base simple o múltiple.

25 La polarización de fluorescencia es otro método que puede usarse para la
detección de un amplicón de la presente invención. Siguiendo este método, se
diseña un oligonucleótido que se superpone con la unión de ADN genómico

flanqueante e insertado. El oligonucleótido es hibridado al producto de PCR de hebra simple desde la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y es incubado en presencia de una polimerasa de ADN y un ddNTP (didesoxinucleótido trifosfato) marcado fluorescente. La extensión de bases simples logra la incorporación de ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la inserción de transgén/secuencia flanqueante debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de base simple.

Se han descrito marcadores moleculares para el uso en la detección de secuencia. En síntesis, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET (sigla en inglés de "transferencia energética de resonancia de fluorescencia") que se superpone con la unión de ADN de inserción y genómico flanqueante. La estructura de carácter único de la sonda FRET logra el contenido de estructura secundaria que mantiene las porciones fluorescentes y de apagado en cercana proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) son ciclados en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Luego de la exitosa amplificación de PCR, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia blanco logra la remoción de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las porciones fluorescentes y de apagado. Se obtiene una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserción de transgén debido a la exitosa amplificación e hibridación.

El ensayo de sonda de hidrólisis, conocido de otro modo como TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.), es un método de detección y cuantificación de la presencia de una secuencia de ADN. EN síntesis, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con la unión de ADN de

inserción y flanqueante genómico. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) son ciclados en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Durante la amplificación específica, la polimerasa de ADN Taq limpia y libera la
 5 porción fluorescente de la porción de apagado en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción de transgén/flanqueante debido a la exitosa amplificación e hibridación.

Otro desafío, entre muchos, es el hallazgo de un gen de referencia adecuado para un ensayo determinado. Por ejemplo, como se establece en el
 10 resumen de la referencia de Czechowski *et al.*: "Un grupo excepcionalmente grande de datos de estudios GeneChip de genoma completo de Affymetrix ATH1 proporcionaron los medios para la identificación de una nueva generación de genes de referencia con niveles de expresión muy estables en la especie de planta modelo *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Se hallaron cientos de genes
 15 de *Arabidopsis* que superaron a los genes de referencia tradicionales en términos de estabilidad de expresión durante todo el desarrollo y en un rango de condiciones ambientales" (Czechowski *et al.* (2005): "Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.*, **139**, 5–17.)

20 Brodmann *et al.* (2002) se refiere a la detección de PCR cuantitativa en tiempo real, de contenido de maíz transgénico en alimentos para cuatro variedades de maíz diferentes aprobadas en la Unión Europea. Brodmann, P. D. P. D.; Ilg, E. C.; Berthoud, H.; y Herrmann, A.: "Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize
 25 Varieties and Maize DNA Content in Food." *J. of AOAC international* 2002 85 (3).

Hernandez *et al.* (2004) menciona cuatro genes posibles para el uso con la PCR en tiempo real. Hernandez, M.; Duplan, M. N.; Berthier, G.; Vaitilingom, M.;

Hauser, W.; Freyer, R.; Pla, M.; y Bertheau, Y.: "Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L.". *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 4632–4637.

Costa *et al.* (2007) observaron estos cuatro genes (también en el contexto
5 de la PCR en tiempo real) y concluyeron que los genes de alcohol
deshidrogenasa y zeína eran los mejores genes de referencia para la detección
de un "evento" de muestra (un gen de lectina) para cuestiones de entremezcla de
alimentaciones transgénicas. Costa, L. D., y Martinelli, L.: "Development of a
Real-Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining an
10 Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Components". *J.*
Agric. Food Chem., 2007, 55, 1264–1273.

Huang *et al.* (2004) utilizaron el plásmido pMulM2 como moléculas de
referencia para la detección de transgenes MON810 y NK603 en maíz. Huang y
Pan: "Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex
15 and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods", *J. Agric. Food Chem.*,
2004, 52 (11), pp. 3264–3268.

Gasparic *et al.* (2008) sugieren la tecnología de LNA, a partir de una
comparación a la tecnología de sonda de ciclado, TaqMan, y diversas químicas
de PCR en tiempo real, para el análisis cuantitativo de eventos de maíz (tales
20 como MON810). Gašparič, Cankar, Žel y Gruden: "Comparison of different real-
time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of
genetically modified organisms", *BMC Biotechnol.*, 2008; 8: 26.

La Solicitud de Patente US 20070148646 se refiere a un método de
extensión de cebador para la cuantificación, que requiere la controlada
25 distribución de nucleótidos individuales que pueden ser detectados y cuantificados
por la cantidad de nucleótidos incorporados. Este método es diferente del método
de PCR TaqMan que utiliza un gen de referencia interna.

A fin de distinguir entre genotipos homocigotos y hemicigotos de TC1507, se ha utilizado con éxito para este evento un ensayo Invader. Gupta, M.; Nirunsuksiri, W.; Schulenberg, G.; Hartl, T.; Novak, S.; Bryan, J.; Vanopdorp, N.; Bing, J.; y Thompson, S.: "A non-PCR-based Invader Assay Quantitatively
5 Detects Single-Copy Genes in Complex Plant Genomes". *Mol. Breeding*, 2008, 21, 173-181.

Huabang (2009) se refiere al ensayo de cigosidad sobre la base de la PCR, de maíz transgénico. Sin embargo, no parece utilizarse gen de referencia. Huabang: "An Accurate and Rapid PCR-Based Zygosity Testing Method for
10 Genetically Modified Maize", *Molecular Plant Breeding*, 2009, Vol. 7, Nro. 3, 619-623.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención provee ensayos para la detección de la presencia
15 del evento de maíz AAD-1 designado DAS-40278-9 (que tiene las semillas depositadas en la American Type Culture Collection (ATCC) (Colección de Cultivos de Tipo Americano) con el Nro. de Acceso PTA-10244), en una muestra (por ejemplo, de grano de maíz). Se proveen además los equipos y las condiciones útiles para conducir los ensayos.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte a ensayos
20 de PCR TaqMan de criterio de valoración para el evento de AAD-1 en maíz, utilizando un gen de referencia endógeno de maíz. Algunas realizaciones se dirigen a ensayos que son capaces de un análisis de cigosidad de alto rendimiento. La presente invención además se refiere, en parte, al descubrimiento
25 de un gen de referencia de invertasa preferido para el uso en la determinación de la cigosidad.

Por lo tanto, asimismo, la invención se refiere, en parte, al cultivo de plantas incorporando cualquiera de los métodos de detección presentes. En algunas realizaciones, dicho evento puede ser “acumulado” con otros rasgos, que incluyen, por ejemplo, otros genes de tolerancia a herbicidas o proteínas inhibidoras de insectos. Los presentes procedimientos pueden usarse a fin de identificar de manera única líneas de maíz que comprenden el evento de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

10 La Figura 1 muestra una estrategia de clonación para la inserción de ADN en el Evento de maíz DAS-40278-9.

La Figura 2 es un diagrama de los cebadores utilizados en la amplificación de PCR para la confirmación de regiones de borde flanqueantes del Evento de maíz DAS-40278-9. El diagrama esquemático representa las ubicaciones de
15 cebador para la confirmación del secuenciamiento de longitud completa del evento de maíz AAD-1 DAS-40278-9 de bordes 5' a 3'.

La Figura 3 muestra una estrategia de clonación para las secuencias de borde flanqueantes del evento de maíz DAS-40278-9. El ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 fue digerido con *EcoR* V, *Stu* I, o *Sca* I, y
20 genotecas correspondientes generadas GenomeWalker™, que se usaron como patrones para la amplificación de las secuencias de ADN blanco.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEC. ID. NRO.: 1 proporciona una secuencia de secuencias flanqueantes
25 genómicas 5' y 3' en cualquiera de los laterales de la inserción AAD-1, que incluye la inserción, para el evento de maíz DAS-40278-9.

SEC. ID. NROS.: 2–7 son cebadores y sondas para el uso de acuerdo con la presente invención.

SEC. ID. NRO.: 8 es el amplicón del evento ejemplificado.

SEC. ID. NRO.: 9 es el amplicón de referencia ejemplificado.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El evento de maíz AAD–1 transgénico (que proporciona tolerancia a herbicidas) DAS–40278–9 fue generado mediante la transformación mediada por *whisker*. Se clonaron tanto la secuencia flanqueante de extremo 5' como la 3' de esta inserción de transgén AAD–1, se secuenciaron y se caracterizaron como se detalla en el documento USSN 61/235.248 (presentado el 19 de agosto de 2009).

Se diseñaron cebadores TAQMAN específicos y una sonda, como se detalla en esta solicitud, en parte, de acuerdo con las secuencias de ADN ubicadas en la unión 5' inserción–a–planta. La especificidad de evento de los cebadores y la sonda se ensayó con éxito en formato de dupla con la invertasa de maíz como un gen de referencia en la PCR de tiempo real contra 16 diferentes eventos de maíz AAD–1 y dos variedades de maíz no transgénicas. Los procedimientos para los ensayos TAQMAN específicos de evento de criterio de valoración para DAS–40278–9 de maíz AAD–1 fueron desarrollados como se detalla en esta solicitud.

La secuencia que cubría la región de la unión de integración entre el ADN de la planta huésped y la construcción de gen integrada en este maíz AAD–1 es una secuencia de carácter único, que se usó para desarrollar ensayos específicos de evento (PCR convencional o PCR en tiempo real), a fin de detectar la presencia de DAS–40278–9 de maíz AAD–1 para el ensayo de GMO (sigla en inglés de “organismo genéticamente modificado”), y a fin de determinar el estado de cigosidad de las plantas en las poblaciones de cultivo. El ensayo TAQMAN

específico de evento informado en esta solicitud puede emplearse para ambas aplicaciones.

La presente invención provee ensayos para la detección de la presencia del evento de maíz transgénico presente DAS-40278-9 (también conocido como pDAS1740-278) en una muestra. Los aspectos de la presente invención incluyen
5 métodos para el diseño y la producción de cualquier molécula de ácido nucleico de diagnóstico ejemplificada o sugerida en esta solicitud.

Esta invención además se refiere, en parte, al cultivo de plantas con la incorporación de cualquiera de estos métodos. En algunas realizaciones, el
10 presente evento puede “acumularse” con otros rasgos (tales como otros genes de tolerancia a herbicidas o genes que codifican proteínas inhibitorias de insectos. Las líneas de plantas que comprenden el presente evento pueden ser detectadas usando secuencias descriptas y sugeridas en esta solicitud.

En algunas realizaciones, esta invención se refiere a la identificación de
15 líneas de maíz tolerantes a herbicidas. La presente invención se refiere, en parte, a la detección de la presencia del presente evento a fin de determinar si la descendencia de un cruce sexual contiene el evento de interés. Además, se incluye un método para la detección del evento, que es útil, por ejemplo, en el cumplimiento de las regulaciones que requieren la aprobación previa al
20 lanzamiento en el mercado y la rotulación de alimentos derivados de plantas de cultivos biotecnológicos.

La presente invención se refiere, en parte, a un ensayo de PCR TaqMan de criterio de valoración sobre la base de la fluorescencia, que utiliza un gen endógeno como un control de referencia (número de copias) para el análisis de
25 citosidad de alto rendimiento del evento de maíz AAD-1. La presente invención además se refiere, en parte, al descubrimiento de un gen de referencia preferido, la *invertasa*. Se identificaron varios genes de referencia como posibles opciones.

Asimismo, la presente invención se refiere, en parte, al desarrollo de una PCR TaqMan de criterio de valoración de dupla para el análisis de cigosidad específico de evento de AAD-1. Además, la presente invención se refiere, en parte, al desarrollo de equipos de ensayo de cultivo de AAD-1.

5 Los ensayos TaqMan de criterio de valoración se basan en una estrategia de más/menos, por la cual el "más" significa que la muestra es positiva para el gen ensayado, y el "menos" significa que la muestra es negativa para el gen ensayado. Estos ensayos típicamente utilizan dos grupos de oligonucleótidos para la identificación de la secuencia de transgén AAD-1 y la secuencia de gen de tipo
10 silvestre, respectivamente, al igual que sondas marcadas duales para medir el contenido de transgén y secuencia de tipo silvestre.

Si bien el ensayo Invader ha sido una técnica importante para la caracterización de eventos, es muy sensible a la calidad del ADN. Además, el ensayo requiere una alta cantidad de ADN. El ensayo Invader requiere, asimismo,
15 una etapa adicional desnaturalizante, que, si no es apropiadamente manipulada, puede tornar el ensayo Invader no exitoso. Además, el tiempo de ensayo más largo del ensayo Invader es limitado en su flexibilidad para manipular de manera eficiente grandes cantidades de muestras de AAD-1 para el análisis en un contexto comercial. Una ventaja principal de la presente invención es el ahorro de
20 tiempo y la eliminación de la etapa desnaturalizante.

El presente análisis TaqMan de criterio de valoración para la detección de eventos AAD-1 ofrece sorprendentes ventajas en comparación con el ensayo Invader, en particular, en el análisis de grandes cantidades de muestras.

Esta invención puede afectar el desarrollo y la caracterización de rasgos de
25 tolerancia a herbicidas AAD-1 en cultivos que incluyen maíz, soja y algodón.

Se proveen en esta solicitud definiciones y ejemplos a fin de ayudar en la descripción de la presente invención y de guiar a los expertos en el arte en la

práctica de la invención. A menos que se observe lo contrario, los términos deben ser entendidos de acuerdo con el uso convencional por los expertos en el arte pertinente. Se emplea la nomenclatura para las bases de ADN como se expone en el Título 37 CFR (Código de Normas Federales de los Estados Unidos de América) § 1.822. De acuerdo con esta solicitud, el término “descendencia” denota la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora que comprende el evento de maíz AAD-1 DAS-40278-9.

Un “evento” transgénico es producido mediante la transformación de células de plantas con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas que se obtienen a partir de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una ubicación del genoma particular. El término “evento” se refiere al transformante original y a la descendencia del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “evento” además se refiere a la descendencia producida por un cruce exogámico sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN genómico/transgén. Aun después del repetido cruce inverso (backcrossing: cruce de un híbrido con uno de sus progenitores) con un progenitor recurrente, el ADN del transgén insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/transgén) del progenitor transformado se presenta en la descendencia del cruce en la misma ubicación cromosómica. El término “evento” además se refiere a ADN del transformante original y su descendencia, que comprenden el ADN insertado y secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría sea transferido a una descendencia que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como consecuencia de un cruce sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el

transformante original y la descendencia resultante del autocruce) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado.

Una “secuencia de unión” abarca el punto en el cual el ADN insertado en el genoma es ligado a ADN del genoma negativo de maíz que flanquea el punto de inserción. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en eventos de maíz aquí descritos y longitudes similares de ADN flanqueante.

La presente invención se refiere a la identificación del presente evento. Se incluyen en la invención los cebadores de PCR y amplicones relacionados. Estas moléculas pueden usarse para la detección o identificación de variedades de maíz transgénicas comercializadas o líneas derivadas de las presentes líneas de maíz transgénicas.

La secuencia entera de la inserción, junto con porciones de las respectivas secuencias flanqueantes, se proporcionan en esta solicitud como SEC. ID. NRO.: 1. Las coordenadas de la inserción y las secuencias flanqueantes para este evento con respecto a SEC. ID. NRO.: 1 (8557 pares de bases en total) se presentan a continuación.

	5' Flanqueante	Inserción	3' Flanqueante
residuo #s (SEC.: 29):	1–1873	1874–6689	6690–8557
longitud (p. b.):	1873 p. b.	4816 p. b.	1868 p. b.

Los componentes de la inserción AAD–1 y secuencias flanqueantes para este evento se ilustran adicionalmente en las Figuras 1 a 3.

Las técnicas de detección de la presente invención pueden usarse en conjunto con el cultivo de plantas, a fin de determinar las plantas de descendencia que comprenden un evento determinado, luego de que una planta progenitora que comprende un evento de interés es cruzada con otra línea de planta en un esfuerzo para impartir uno o más rasgos adicionales de interés en la

descendencia. Los presentes métodos son útiles, por ejemplo, en programas de cultivo de maíz, al igual que en el control de calidad, especialmente, para semillas de maíz transgénico comercializadas. Además, pueden beneficiar el registro de productos y el gerenciamiento de productos. Estos métodos pueden usarse para

5 estrategias de cultivo aceleradas.

En algunas realizaciones, el ensayo TaqMan de criterio de valoración sobre la base de la fluorescencia para el análisis de cigosidad permite la lectura directa de los resultados en un lector de placa, para la identificación del evento de AAD-1 en maíz y el gen de referencia.

10 La presente invención incluye aplicaciones de cultivo tales como el ensayo de la introgresión del evento de AAD-1 en otras líneas de maíz.

Los métodos de detección y equipos de la presente invención pueden usarse para la identificación de eventos de acuerdo con la presente invención. Los métodos y equipos de la presente invención pueden usarse para estrategias

15 de cultivo aceleradas y para establecer información de unión.

Las técnicas de detección de la presente invención son especialmente útiles en conjunto con el cultivo de plantas, a fin de determinar las plantas de la descendencia que comprenden un evento determinado, luego de que una planta progenitora que comprende un evento de interés es cruzada con otra línea de

20 planta en un esfuerzo para impartir uno o más rasgos adicionales de interés en la descendencia. Estos métodos de análisis de PCR TaqMan benefician a los programas de cultivo de maíz, al igual que al control de calidad, especialmente, para semillas de maíz transgénico comercializadas. Los equipos de detección de PCR TaqMan para estas líneas de maíz transgénicas ahora también pueden

25 llevarse a cabo y utilizarse. Esto además puede beneficiar el registro de productos y el gerenciamiento de productos.

Aun adicionalmente, los presentes métodos pueden usarse para el estudio y caracterización de procesos de integración de transgenes, características de sitios de integración genómica, clasificación de eventos, estabilidad de transgenes y sus secuencias flanqueantes, y expresión de genes (en especial, relacionados con el silenciamiento de genes, patrones de metilación de transgenes, efectos de posición y potenciales elementos relacionados con la expresión, tales como MARS [regiones de unión de matriz], y similares).

De acuerdo con la presente solicitud, el término "maíz" significa maíz (*Zea mays*) e incluye todas sus variedades que pueden cultivarse con maíz.

Esta invención además incluye procesos para la realización de cruces y el uso de métodos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye un método para la producción de una semilla híbrida F_1 mediante el cruce de una planta ejemplificada con una planta diferente (por ejemplo, progenitora endogámica), la cosecha de la semilla híbrida resultante, y la detección del presente evento. Las características de las plantas resultantes también pueden ser mejoradas mediante la incorporación de los métodos de la presente invención.

Puede cultivarse primero una planta de maíz tolerante a herbicida, mediante el cruce sexual de una primera planta de maíz progenitora que consiste en una planta de maíz cultivada a partir de semillas de una línea referida en esta solicitud, y una segunda planta de maíz progenitora, a fin de producir una pluralidad de plantas de primera descendencia; y luego, la selección de una planta de primera descendencia que es resistente a un herbicida (o que posee un evento de la presente invención); y el autocruce de la planta de primera descendencia, a fin de producir una pluralidad de plantas de segunda descendencia; y a continuación, la selección, entre las plantas de segunda descendencia, de una planta que es resistente a un herbicida (o que posee por lo menos uno de los eventos). Estas etapas además pueden incluir el cruce inverso

(*backcrossing*) de la planta de primera descendencia o de la planta de segunda descendencia con la segunda planta de maíz progenitora, o una tercera planta de maíz progenitora. Luego puede plantarse un cultivo de maíz que comprende semillas de maíz de la presente invención, o su descendencia.

5 Debe entenderse además que dos plantas transgénicas diferentes pueden ser también apareadas a fin de producir descendencia que contiene dos genes exógenos agregados independientemente segregadores. El autocruce de la descendencia apropiada puede producir plantas homocigotas para ambos genes exógenos agregados. Se contemplan también el cruce inverso con una planta
10 progenitora y el cruce exogámico con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Otros métodos de cultivo comúnmente utilizados para diferentes rasgos y cultivos son conocidos en el arte. El cultivo de cruce inverso ha sido empleado para transferir genes para un rasgo simplemente heredado, altamente hereditario, a una línea endogámica o un cultivar homocigoto deseable,
15 que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo por ser transferido se denomina el progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donante. Luego del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y se cruzan
20 repetidamente (cruce inverso) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donante.

La presente invención puede usarse en conjunto con un método de cultivo asistido por marcador (MAB, según su sigla en inglés). Asimismo, las moléculas
25 de ADN de la presente invención pueden usarse con otros métodos (tales como marcadores AFLP (sigla en inglés de "polimorfismo de longitud de fragmento amplificado"), marcadores RFLP (sigla en inglés de "polimorfismo de longitud de

fragmento de restricción”), marcadores RAPD (sigla en inglés de “ADN polimórfico amplificado aleatoriamente”), SNP (sigla en inglés de “polimorfismo de nucleótido único”) y SSR (sigla en inglés de “repetición de secuencia simple”)) que identifican rasgos agrícola-mente útiles genéticamente ligados. El rasgo de resistencia a herbicida puede ser rastreado en la descendencia de un cruce (o su descendencia y cualquier otro cultivar o variedad) usando los métodos MAB. Los métodos de la presente invención pueden usarse para la identificación de cualquier variedad de maíz que tenga el presente evento.

Los métodos de la presente invención incluyen un método para la producción de una planta de maíz tolerante a herbicida, donde dicho método comprende el cultivo de una planta que tiene un evento de la presente invención. Los métodos preferidos además comprenden la selección de la descendencia de dicho cruce, mediante el análisis de dicha descendencia para detectar un evento detectable de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para rastrear el presente evento a través de ciclos de cultivo con plantas que comprenden otros rasgos deseables, tales como rasgos agrícolas. Las plantas que comprenden el evento de la presente invención y el rasgo deseado pueden ser detectadas, identificadas, seleccionadas, y rápidamente utilizadas, por ejemplo, en posteriores rondas de cultivo. El presente evento/rasgo también puede combinarse a través del cultivo, y rastrearse de acuerdo con la presente invención, con uno o más rasgos resistentes a insectos o con otros rasgos de tolerancia a herbicidas. Una realización preferida de este último caso es una planta que comprende el presente evento combinado con un gen que codifica la resistencia a un herbicida de imidazolinona, glifosato o glufosinato. Puede usarse un gen de tolerancia a dicamba, en algunas realizaciones.

Por lo tanto, la presente invención puede combinarse, por ejemplo, con rasgos que codifican la resistencia a glifosato (por ejemplo, *EPSPS*, *GOX*, *GAT* bacteriano o de planta resistente), la resistencia a glufosinato (por ejemplo, *Pat*, *bar*), la resistencia al herbicida inhibidor de acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo, imidazolinonas [tales como imazetapir], sulfonilureas, triazolopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzoatos y otras químicas [*Csr1*, *SurA*, *et al.*]), resistencia a bromoxinilo (por ejemplo, *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a inhibidores de fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II (por ejemplo, *psbA*), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema I, resistencia a herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (por ejemplo, *PPO-1*), resistencia a herbicidas de fenilurea (por ejemplo, *CYP76B1*), enzimas degradantes de dicamba (ver, por ejemplo, el documento US 20030135879), y otros, que podrían acumularse solos o en múltiples combinaciones a fin de proporcionar la capacidad de controlar o prevenir de manera eficaz los recambios de malas hierbas, y la resistencia a cualquier herbicida de las clases mencionadas.

Con respecto a herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS preferidos adicionales (también conocidos como AHAS) incluyen las triazolopirimidina sulfonanilidas (tales como cloransulam-metilo, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam); pirimidiniltiobenzoatos (tales como bispiribac y piritiobac) y flucarbazona. Algunos inhibidores de HPPD preferidos incluyen mesotriona, isoxaflutol y sulcotriona. Algunos inhibidores de PPO preferidos incluyen flumiclorac, flumioxazina, flufenpir, piraflufeno, flutiacet, butafenacilo, carfentrazona, sulfentrazona y los difeniléteres (tales como acifluorfen, fomesafen, lactofeno y oxifluorfen).

Además, AAD-1 solo o acumulado con uno o más rasgos de HTC (sigla en inglés de "cultivo tolerante a herbicida") adicionales pueden acumularse con uno o más rasgos adicionales de entrada (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia fúngica, o tolerancia al estrés, *et al.*) o de salida (por ejemplo, mayor rendimiento, mejor perfil de aceite, mejor calidad de fibra, *et al.*). Por lo tanto, la presente invención puede usarse a fin de proporcionar un paquete agronómico completo de mejor calidad de cultivo con la capacidad de controlar de manera flexible y eficaz, desde el punto de vista de costo-beneficio, cualquier cantidad de plagas agrícolas.

De acuerdo con esta solicitud, una "línea" es un grupo de plantas que exhibe poca o nula variación genética entre los individuos para al menos un rasgo. Dichas líneas pueden ser creadas por varias generaciones de autopolinización y selección, o la propagación vegetativa a partir de un solo progenitor usando técnicas de cultivo de células o tejido.

De acuerdo con la presente solicitud, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos, y se refieren a una línea que se usa para la producción comercial.

Los términos "estabilidad" o "estable" significan que, con respecto al componente determinado, el componente se mantiene de generación en generación, y preferentemente, por lo menos tres generaciones, sustancialmente con el mismo nivel; por ejemplo, sustancialmente el mismo nivel, por ejemplo, preferentemente, $\pm 15\%$, más preferentemente, $\pm 10\%$, con mayor preferencia, $\pm 5\%$. La estabilidad puede ser afectada por la temperatura, la ubicación, el estrés y el momento de la plantación. La comparación de posteriores generaciones en las condiciones de campo debe producir el componente de manera similar.

La "utilidad comercial" se define por tener buen vigor de planta y alta fertilidad, de manera que el cultivo pueda ser producido por los productores agrícolas usando equipamiento agrícola convencional, y el aceite con los

componentes descriptos pueda ser extraído de las semillas usando equipamiento de trituración y extracción convencional. Con el fin de ser comercialmente útil, el rendimiento, medido por peso de semillas, contenido de aceite y aceite total producido por acre, se encuentra dentro del 15% del rendimiento promedio de una
5 variedad de maíz comercial de otro modo comparable, sin los rasgos de valor de primera calidad, desarrollada en la misma región.

“De elite agrícola” significa que una línea tiene características agrícolas deseables tales como rendimiento, madurez, resistencia a enfermedades, y similares, además de la resistencia a insectos, debido a los presentes eventos.
10 Los rasgos agrícolas son tomados individualmente o en cualquier combinación.

Como reconocerá el experto en el arte en vista de esta descripción, las realizaciones preferidas de los equipos de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y cebadores. A modo de ejemplo, esto incluye sondas de polinucleótidos, cebadores y amplicones, como se indica en esta solicitud.

15 El experto en el arte además reconocerá que los cebadores y las sondas pueden diseñarse a fin de hibridar, en un rango de condiciones de hibridación y PCR convencionales, a un segmento de SEC. ID. NRO.: 1 (o el complemento), y sus complementos, donde el cebador o la sonda no es perfectamente complementario a la secuencia ejemplificada. Esto es, puede tolerarse cierto
20 grado de no coincidencia. Para un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, por ejemplo, típicamente, no es necesario que alrededor de uno o dos nucleótidos se unan con la hebra opuesta si la base sin coincidencia es interna o se encuentra en el extremo del cebador opuesto al amplicón. A continuación se proveen diversas condiciones de hibridación apropiadas. Los análogos de nucleótidos
25 sintéticos, tales como inosina, pueden usarse también en sondas. Además, pueden utilizarse sondas de ácido nucleico peptídico (PNA, según su sigla en inglés), al igual que sondas de ADN y ARN. Es importante que dichas sondas y

cebadores sean herramientas de diagnóstico (capaces de identificar y distinguir en forma única) para detectar la presencia de un evento de la presente invención.

Los componentes de cada una de las "inserciones" se ilustran en las **Figuras 1 a 3**. Las secuencias de polinucleótidos de ADN de estos componentes, o sus fragmentos, pueden usarse como sondas o cebadores de ADN en los métodos de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, se proveen composiciones y métodos para la detección de la presencia de la región de inserción de transgén/genómica, en plantas y semillas y similares, de una planta de maíz.

En algunas realizaciones, las secuencias de ADN que comprenden un fragmento contiguo de la nueva región de inserción de transgén/genómica constituyen un aspecto de esta invención. Se incluyen las secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia de inserción de transgén y una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia genómica de maíz o secuencias útiles como secuencias de cebador para la producción de un producto de amplicón de diagnóstico para una o más de estas plantas de maíz.

Las realizaciones relacionadas se refieren a secuencias de ADN que comprenden por lo menos 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; o más nucleótidos contiguos de una porción de transgén de una secuencia de ADN identificada en esta solicitud, o sus complementos. Dichas secuencias pueden ser útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos usando estos cebadores son herramientas de diagnóstico para el evento de maíz referido en esta solicitud. Por lo tanto, la invención además incluye amplicones y amplicones producidos por dichos cebadores de ADN y cebadores homólogos.

La invención incluye métodos de detección de la presencia de ADN en una muestra, que corresponde al evento de maíz referido en esta solicitud. Dichos métodos pueden comprender: (a) el contacto de la muestra que comprende ADN con un grupo de cebadores que, cuando se utiliza en una reacción de
5 amplificación de ácido nucleico con ADN de por lo menos uno de estos eventos de maíz, produce un amplicón que es herramienta de diagnóstico para dichos eventos; (b) la realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico, a fin de producir el amplicón; y (c) la detección del amplicón.

Otros métodos de detección de la presente invención incluyen un método
10 de detección de la presencia de un ADN en una muestra, correspondiente a por lo menos uno de dichos eventos, donde dicho método comprende: (a) el contacto de la muestra que comprende el ADN con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN de por lo menos uno de dichos eventos de maíz, y que no hibrida en las condiciones de hibridación rigurosas con una planta de maíz
15 de control (ADN sin evento de interés); (b) el sometimiento de la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) la detección de la hibridación de la sonda al ADN.

Esta invención incluye métodos de detección de la presencia de ADN en una muestra, de por lo menos una de las plantas de maíz referidas en esta
20 solicitud. Dichos métodos pueden comprender: (a) el contacto de la muestra que comprende el ADN con un grupo de cebadores que se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico de la presente invención, con ADN de por lo menos uno de estos eventos de maíz; (b) la realización de una reacción de amplificación de PCR TAQMAN usando un gen de referencia identificado en esta
25 solicitud; y (c) el análisis de los resultados.

Aun en otras realizaciones, la presente invención incluye métodos para la producción de una planta de maíz que comprende el evento de AAD-1 de la

presente invención, donde dicho método comprende las etapas de: (a) el cruce sexual de una primera línea de maíz progenitora (que comprende un casete de expresión de la presente invención, que confiere dicho rasgo de resistencia a herbicida a las plantas de dicha línea) y una segunda línea de maíz progenitora (que carece de este rasgo de tolerancia a herbicidas), a fin de producir una pluralidad de plantas de descendencia; y (b) la selección de una planta de descendencia mediante el uso de marcadores moleculares. Dichos métodos pueden comprender, opcionalmente, la etapa adicional del cruce inverso de la planta de descendencia con la segunda línea de maíz progenitora a fin de producir una planta de maíz de cultivo legítimo que comprende dicho rasgo de tolerancia a herbicida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen métodos de determinación de la cigosidad de la descendencia de un cruce que involucra el presente evento. Dichos métodos pueden comprender el contacto de una muestra, que comprende ADN de maíz, con un grupo de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de por lo menos uno de dichos eventos de maíz, producen un primer amplicón que es herramienta de diagnóstico para al menos uno de dichos eventos de maíz. Dichos métodos además comprenden la realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico, a fin de producir el primer amplicón; la detección del primer amplicón; y el contacto de la muestra que comprende ADN de maíz con dicho grupo de cebadores, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de maíz, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico de maíz nativo homólogo a la región genómica de maíz; y la realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico, a fin de producir el segundo amplicón. Los métodos además comprenden la detección del

segundo amplicón, y la comparación del primer y el segundo amplicones en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigota para la inserción del transgén.

Puede desarrollarse equipos de detección de ADN usando las composiciones descritas en esta solicitud y métodos bien conocidos en el arte de la detección de ADN. Los equipos son útiles para la identificación del presente ADN de evento de maíz en una muestra, y pueden ser aplicados a métodos para el cultivo de plantas de maíz que contienen este ADN. Los equipos contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias a los amplicones, por ejemplo, descriptos en esta solicitud, o a secuencias de ADN homólogas o complementarias a ADN contenido en los elementos genéticos de transgenes de los presentes eventos. Estas secuencias de ADN pueden usarse en reacciones de amplificación de ADN, o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los equipos además pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la realización del método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada que está unida a una marca detectable convencional, o una molécula reportera (tal como un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o una enzima). Dicha sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico blanco, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico de uno de dichos eventos de maíz, ya sea de una planta de maíz, ya sea de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino además, poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN blanco y pueden usarse para la detección de la presencia de dicha secuencia de ADN blanco.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados/sintetizados que son anelados (*annealing*: proceso de enfrentamiento y apareamiento de dos hebras de nucleótidos o parte de esas hebras) a una hebra de ADN blanco complementaria por medio de la hibridación de ácido nucleico, a fin de formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN blanco; y luego son extendidos a lo largo de la hebra de ADN blanco por una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. Los pares de cebadores de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico blanco, por ejemplo, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Las sondas y los cebadores son, en general, de 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127; 128; 129; 130; 131; 132; 133; 134; 135; 136; 137; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 149; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 166; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199; 200; 201; 202; 203; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216; 217; 218; 219; 220; 221; 222; 223; 224; 225; 226; 227; 228; 229; 230; 231; 232; 233; 234; 235; 236; 237; 238; 239; 240; 241; 242; 243; 244; 245; 246; 247; 248; 249; 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292;

293; 294; 295; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308;
 309; 310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324;
 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338; 339; 340;
 341; 342; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350; 351; 352; 353; 354; 355; 356;
 5 357; 358; 359; 360; 361; 362; 363; 364; 365; 366; 367; 368; 369; 370; 371; 372;
 373; 374; 375; 376; 377; 378; 379; 380; 381; 382; 383; 384; 385; 386; 387; 388;
 389; 390; 391; 392; 393; 394; 395; 396; 397; 398; 399; 400; 401; 402; 403; 404;
 405; 406; 407; 408; 409; 410; 411; 412; 413; 414; 415; 416; 417; 418; 419; 420;
 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430; 431; 432; 433; 434; 435; 436;
 10 437; 438; 439; 440; 441; 442; 443; 444; 445; 446; 447; 448; 449; 450; 451; 452;
 453; 454; 455; 456; 457; 458; 459; 460; 461; 462; 463; 464; 465; 466; 467; 468;
 469; 470; 471; 472; 473; 474; 475; 476; 477; 478; 479; 480; 481; 482; 483; 484;
 485; 486; 487; 488; 489; 490; 491; 492; 493; 494; 495; 496; 497; 498; 499; ó 500
 polinucleótidos o más de longitud. Dichas sondas y cebadores hibridan
 15 específicamente a una secuencia blanco en condiciones de hibridación de alta
 rigurosidad. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la
 presente invención tienen similitud de secuencia completa con respecto a la
 secuencia blanco, si bien pueden diseñarse sondas que difieren de la secuencia
 blanco y que retienen la capacidad de hibridar a secuencias blanco, por medio de
 20 métodos convencionales.

Los métodos para la preparación y el uso de sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989. Los pares de cebadores de PCR pueden derivar de una
 25 secuencia conocida, por ejemplo, empleando programas informáticos propuestos para dicho uso.

Los cebadores y las sondas sobre la base del ADN flanqueante y las secuencias de inserción que se describen en esta solicitud pueden usarse a fin de confirmar (y, si es necesario, corregir) las secuencias descriptas, por métodos convencionales, por ejemplo, mediante la reclonación y el secuenciamiento de
5 dichas secuencias.

Los cebadores y las sondas de ácido nucleico de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas a una secuencia de ADN blanco. Puede usarse cualquier método convencional de amplificación o hibridación de ácido nucleico, para la identificación de la presencia de ADN de un evento transgénico en una
10 muestra. Las moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos son capaces de hibridar a otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. De acuerdo con esta solicitud, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico de doble hebra, antiparalela. Se dice que una
15 molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si estas exhiben complementariedad completa. De acuerdo con esta solicitud, se dice que las moléculas exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente
20 complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer aneladas entre sí, en condiciones de por lo menos "baja rigurosidad" convencional. Asimismo, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer aneladas entre sí en condiciones convencionales de "alta
25 rigurosidad". Las condiciones de rigurosidad convencionales son descriptas por Sambrook *et al.*, 1989. Por lo tanto, son permisibles las desviaciones de la complementariedad completa, siempre que dichas desviaciones no evitan por

completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble hebra. Con el objetivo de que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o una sonda, solo debe ser suficientemente complementaria en términos de secuencia, para poder formar una estructura de doble hebra estable en el
5 solvente particular y las concentraciones de sal empleadas.

De acuerdo con esta solicitud, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente al complemento de la secuencia de ácido nucleico con la cual se compara, en condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas" es funcionalmente definido con
10 respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico blanco (es decir, a una secuencia de interés de ácido nucleico particular) por el procedimiento de hibridación específico descrito en la referencia de Sambrook *et al.*, 1989, en 9.52–9.55. Ver, además, la referencia de Sambrook *et al.*, 1989, en 9.47–9.52 y 9.56–9.58. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de la invención
15 pueden usarse por su capacidad para formar selectivamente moléculas de dupla con tramos de complementariedad de fragmentos de ADN.

De acuerdo con la aplicación contemplada, pueden usarse diversas condiciones de hibridación a fin de lograr diferentes grados de selectividad de la sonda hacia la secuencia blanco. Para aplicaciones que requieren alta
20 selectividad, típicamente se emplearán condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos; por ejemplo, se seleccionarán condiciones de sal relativamente bajas y condiciones de alta temperatura, tales como aquellas proporcionadas por NaCl, 0,02 M a aproximadamente 0,15 M, a temperaturas de alrededor de 50°C a alrededor de 70°C. Las condiciones rigurosas, por ejemplo,
25 podrían involucrar el lavado del filtro de hibridación por lo menos dos veces con regulador de lavado de alta rigurosidad (0,2 X SSC, 0,1% SDS, 65°C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN, por

ejemplo, 6,0 X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45°C, seguido de un lavado de 2,0 X SSC a 50°C, son conocidas por los expertos en el arte. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 X SSC a 50° C, a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 X SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede incrementarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, de alrededor de 22°C, a condiciones de alta rigurosidad, a alrededor de 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal puede mantenerse constante, mientras se cambia la otra variable. Dichas condiciones selectivas toleran poca o nula no coincidencia entre la sonda y el patrón o la hebra blanco. La detección de secuencias de ADN mediante la hibridación es bien conocida por los expertos en el arte, y las descripciones de las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.965.188 y 5.176.995 son ejemplares de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente a uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificados o sugeridos en esta solicitud, que incluyen sus complementos y fragmentos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC. ID. NROS.: 2-7, o sus complementos o fragmentos.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de marcador de la presente invención comparte entre 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con dichas secuencias de ácido nucleico. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de marcador de la presente invención comparte entre 95% y 100% de identidad de secuencia con dicha secuencia. Dichas secuencias pueden usarse como

marcadores en métodos de cultivo de plantas, a fin de identificar la descendencia de cruces genéticos. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN blanco puede detectarse por cualquier cantidad de métodos conocidos por los expertos en el arte, que incluyen, sin limitación, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, 5 marcas a base de anticuerpos, y marcas quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico blanco (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten la hibridación del par de cebadores solo a la secuencia de ácido nucleico blanco a la cual se unirá un 10 cebador que tiene la correspondiente secuencia de tipo silvestre (o su complemento), y preferentemente, la producción de un producto de amplificación único, el amplicón.

El término "específico para (una secuencia blanco)" indica que una sonda o un cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solo a la secuencia 15 blanco en una muestra que comprende la secuencia blanco.

De acuerdo con esta solicitud, el término "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico blanco que es parte de un patrón de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene ADN 20 genómico de evento transgénico de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de planta de maíz puede someterse al método de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de secuencia flanqueante en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción de ADN heterólogo insertado, y un segundo 25 cebador derivado del ADN heterólogo insertado, a fin de producir un amplicón que es herramienta de diagnóstico para detectar la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también es diagnóstico del

evento. El amplicón puede tener una longitud que varía desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, o la longitud combinada de los pares de cebadores más alrededor de 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127; 128; 129; 130; 131; 132; 133; 134; 135; 136; 137; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 149; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 166; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199; 200; 201; 202; 203; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216; 217; 218; 219; 220; 221; 222; 223; 224; 225; 226; 227; 228; 229; 230; 231; 232; 233; 234; 235; 236; 237; 238; 239; 240; 241; 242; 243; 244; 245; 246; 247; 248; 249; 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292; 293; 294; 295; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338; 339; 340; 341; 342; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350; 351; 352; 353; 354; 355; 356; 357; 358; 359; 360; 361; 362; 363; 364; 365; 366; 367; 368; 369; 370; 371; 372; 373; 374; 375; 376; 377; 378; 379; 380; 381; 382; 383; 384; 385; 386; 387; 388; 389; 390; 391; 392; 393; 394; 395; 396; 397; 398; 399; 400; 401; 402; 403; 404; 405; 406; 407; 408; 409; 410; 411; 412; 413; 414; 415; 416; 417;

418; 419; 420; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430; 431; 432; 433;
 434; 435; 436; 437; 438; 439; 440; 441; 442; 443; 444; 445; 446; 447; 448; 449;
 450; 451; 452; 453; 454; 455; 456; 457; 458; 459; 460; 461; 462; 463; 464; 465;
 466; 467; 468; 469; 470; 471; 472; 473; 474; 475; 476; 477; 478; 479; 480; 481;
 5 482; 483; 484; 485; 486; 487; 488; 489; 490; 491; 492; 493; 494; 495; 496; 497;
 498; 499; ó 500; 750; 1000; 1250; 1500; 1750; 2000; o más pares de bases de
 nucleótidos (más o menos cualquiera de los incrementos citados con
 anterioridad). Alternativamente, un par de cebadores puede derivar de secuencia
 flanqueante en ambos laterales del ADN insertado, de modo de producir un
 10 amplicón que incluye la secuencia de nucleótidos de inserción entera. Un
 miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de planta
 puede ubicarse a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia
 puede variar de un par de bases de nucleótidos a alrededor de veinte mil pares de
 bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente
 15 dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación
 térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico puede lograrse por cualquiera de los
 diversos métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en el arte, que
 incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en el arte
 20 una diversidad de métodos de amplificación, que se describen, *inter alia*, en la
 Patente de los Estados Unidos Nro. 4.683.195 y en la Patente de los Estados
 Unidos Nro. 4.683.202. Los métodos de amplificación de PCR han sido
 desarrollados a fin de amplificar hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, al
 igual que otros métodos conocidos en el arte de la amplificación de ADN, pueden
 25 usarse en la práctica de la presente invención. La secuencia de la inserción de
 ADN de transgén heterólogo o la secuencia genómica flanqueante de un presente
 evento de maíz pueden verificarse (y corregirse, en caso de ser necesario),

mediante la amplificación de dichas secuencias a partir del evento, usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en esta solicitud, seguida del secuenciamiento de ADN convencional del amplicón de PCR o del ADN clonado.

5 El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado por una pluralidad de técnicas. La electroforesis de gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio son un método conocido común de detección de amplicones de ADN. Otro método es el análisis de bit genético, donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto con la secuencia de ADN
10 genómica flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido es inmovilizado en los receptáculos de una placa de microrreceptáculos. Luego de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de PCR de hebra simple puede ser hibridado al
15 oligonucleótido inmovilizado y servir como un patrón para una reacción de extensión de base única usando una polimerasa de ADN y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser sobre una base fluorescente o de ensayo ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia de inserción/flanqueante debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de
20 base única.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales y publicaciones referidas o citadas en esta solicitud se incorporan a modo de referencia en su totalidad, al alcance de que no sean inconsecuentes con las descripciones explícitas de esta memoria descriptiva.

25 Se usan las siguientes abreviaturas, a menos que se indique lo contrario.

AAD-1	ariloxialcanoato dioxigenasa-1
p. b.	par de bases

	°C	grados Celcius
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	DIG	digoxigenina
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
5	kb	kilobase
	µg	microgramo
	µl	microlitro
	ml	mililitro
	M	masa molar
10	OLP	sonda superpuesta (según su sigla en inglés)
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa (según su sigla en inglés)
	PTU	unidad de transcripción de planta (según su sigla en inglés)
	SDS	dodecil sulfato de sodio
15	SOP	procedimiento de operación estándar (según su sigla en inglés)
	SSC	una solución reguladora que contiene una mezcla de cloruro de sodio y citrato de sodio, pH 7,0
	TBE	una solución reguladora que contiene una mezcla de base
20	Tris, ácido bórico y EDTA, pH 8,3	
	V	voltios

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Ensayo Taqman específico de evento.

25 Se desarrolló un ensayo Taqman específico de evento a fin de detectar la presencia del evento de maíz DAS-40278-9, y de determinar el estado de cigosidad de las plantas en poblaciones de cultivo. Con el objetivo de desarrollar

un ensayo específico de evento, se diseñaron cebadores y sondas Taqman específicos de acuerdo con las secuencias de ADN ubicadas en la unión 5' inserción a planta. Para la detección específica de DAS-40278-9, se amplificó un fragmento de ADN de 73 p. b. que abarcaba esta unión 5'-integración, usando dos cebadores específicos. La amplificación de este producto de PCR se midió por una sonda MGB (*Minor Groove Binder*: aglutinante de hendidura menor) específica del blanco, sintetizada por Applied Biosystems, que contenía el reportero FAM en su extremo 5'. La especificidad de este método de detección Taqman para el evento de maíz AAD-1 DAS-40278-9 se ensayó contra 16 eventos de maíz diferentes AAD-1 y una variedad de maíz no transgénico en formato de dupla, con el gen de referencia endógeno específico de maíz, *Invertasa*.

Ejemplo 1.1. Aislamiento de ADNg.

En este estudio, se ensayaron muestras de ADNg de 16 eventos de maíz diferentes AAD-1 y variedades de maíz no transgénico. Se extrajo el ADNg con dos enfoques: el equipo Qiagen o CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Para las muestras de ADNg extraídas con el equipo Qiagen, se usaron ocho discos de hoja frescos de maíz para la extracción del ADNg, de acuerdo con un protocolo modificado de equipo de planta Qiagen DNeasy 96 Plant Kit. Para las muestras de ADNg extraídas usando el procedimiento de CTAB, se usaron alrededor de 0,3 g de tejido de hoja liofilizado siguiendo un protocolo de Permingeat *et al.*, 1998. Se cuantificó el ADNg con el método Pico Green de acuerdo con las instrucciones del vendedor (Molecular Probes, Eugene, OR). Las muestras de ADNg se diluyeron con agua libre de DNase a fin de lograr una concentración de 10 ng/μl para el propósito de este estudio.

Ejemplo 1.2. Ensayo Tagman y resultados.

Se diseñaron cebadores y sondas Taqman específicos para el ensayo Taqman específico del evento DAS-40278-9. Estos reactivos pueden usarse con las condiciones citadas a continuación, a fin de detectar el evento de maíz AAD-1 DAS-40278-9. La Tabla 1 cita las secuencias de cebadores y sondas que se desarrollaron específicamente para la detección del evento DAS-40278-9.

Tabla 1. Cebadores y sondas de PCR.

Reacción para blanco de evento		
Denominación	Descripción	Secuencia 5' a 3'
Maíz278-F	Cebador delantero	SEC. ID. NRO.: 2: 5' – ATTCTGGCTTTGCTGTAAATCGT – 3'
Maíz278-R	Cebador inverso	SEC. ID. NRO.: 3: 5' – TTACAATCAACAGCACCGTACCTT – 3'
Maíz278-Sonda	Sonda	SEC. ID. NRO.: 4: 5' – FAM- CTAACCTTCATTGTATTCC-MGB –3'
Reacción de sistema de referencia de invertasa		
Denominación	Descripción	Secuencia 5' a 3'
IVF	Cebador delantero	SEC. ID. NRO.: 5: 5' – TGGCGGACGACGACTTGT – 3'
IVR	Cebador inverso	SEC. ID. NRO.: 6: 5' – AAAGTTTGGAGGCTGCCGT – 3'
IV-Sonda	Sonda	SEC. ID. NRO.: 7: 5' – HEX-CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC-BHQ2 – 3'

10 Las condiciones de PCR múltiples para la amplificación son las siguientes:
1 X regulador de PCR, MgCl₂, 0,5–2,5 mM; dNTP, 0,2 mM; Cebador Maíz-278-F, 0,2 µM; Cebador Maíz-278-R, 0,2 µM; Cebador_IV-F, 0,2 µM; Cebador_IV-R, 0,2 µM; Sonda_ Maíz-278-Sonda, 0,08 µM; Sonda_IV-sonda, 0,08 uM; 40 U/ml de HotStart Taq; 0,6 a 2,4 ug/ml de ADN en una reacción total de 25 µl. Se
15 ensayaron diversas concentraciones de MgCl₂ y ADN. Se usaron concentraciones de 0,5 mM, 1,0 mM, 1,8 mM y 2,5 mM de MgCl₂. El cóctel se amplificó usando las siguientes condiciones: i) 95°C durante 15 min, ii) 95°C durante 20 seg, iii) 60°C

durante 60 seg, iv) repetición de etapas ii–iii durante 50 ciclos, v) mantenimiento a 4°C. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema Bio–rad iCycler™. El análisis de la información se basó en una medición del umbral de ciclo (CT, según su sigla en inglés), que es el número de ciclos de PCR cuando la medición de fluorescencia alcanza un valor establecido. El valor CT se calculó automáticamente por medio del programa informático iCycler software.

Las secuencias de amplicones generadas usando los cebadores anteriores fueron las siguientes:

278F y 278R:

10 ttacaatcaacagcacccgtacctgaagcggaatacaatgaaggtagctacgattacagcaaagcca
gaat (SEC. ID. NRO.: 8)

IVF e IVR:

tggcggacgacgactgtgccgagcagaccgccgtgtactctacgtctcaagggcacggacggcagc
ctccaaacttt (SEC. ID. NRO.: 9)

15 El método de detección Taqman para el evento de maíz AAD–1 DAS–
40278–9 se ensayó contra 16 eventos de maíz diferentes AAD–1 y la variedad de
maíz no transgénica en formato de dupla, con la invertasa endógena específica
de maíz como un gen de referencia. Este ensayo detectó específicamente el
evento de maíz AAD–1 DAS–40278–9, y no produjo ni amplificó ningún resultado
20 positivo falso de los controles (es decir, los 16 eventos de maíz AAD–1 diferentes
y variedades de maíz no transgénicas). Los cebadores y las sondas específicos
del evento pueden usarse para la detección del evento de maíz AAD–1 DAS–
40278–9, y estas condiciones y reactivos son aplicables para los ensayos de
cigiosidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC
<120> DETECCIÓN DEL EVENTO DAS-40278-9 DE AAD-1
<130> DAS-P0169-01
<160> 9
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8557
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Inserción AAD-1 y secuencias flanqueantes

<400> 1
actggtatTTT aatatactTTT aataaatatt attagattcc tcgtcaaaga actTTTTtaca 60
atatatctat ttagaatcat atatgtcata gTTTTTTTTtC taagagtcta gTTTactagt 120
aaaatccgac tcacatTTTT cgaacttggg atgcaacact taaatagtac aaaaccttgg 180
tatgcagtat tttacattgt aagattcaaa atttctaaag cagtatatat atgtttccag 240
aaacttatag atatagaaaa aacagagaga cgtatgcgaa aattcgataa aggtgtacat 300
tggattcgca aggctaaata catattttatc gtggatccat gcagagtTtTg ggtaataaaa 360
ttagatactt ccaatcatgt gccacataat cacgtaacat tagtaattta aatgacatta 420
ccatgtccaa ctgattttaa acacaaactc ttcttgaacc atatagtTtTg acaaaccaaa 480
tatatataac tggagctact agttatgaat caattaaaaa ttactttgaa gattcaacgt 540
agtgccagtt tggctctagc acatctaacc agaagggcta aggctggctt caacaggaac 600
agccaaatcc gagatcgagc catttgccat ttttgggtag ttagtttaac tttcatatat 660
cttcccatcc ttttttgcct agcctaaatg gctttgatgt tgaagaccat attaatttgc 720
ttcagtggca ctaggacaac catattggct ttggctgacc cgttagagtt agcctaattg 780
gtggaagggg agggaagggg aggatcgatg gtggcatgag agaggggTtTg acgatcacga 840
tgatgatgcg agtgaggagg agaggggtggc gacgacacag gggagaaagg agaggggacgc 900
taggagcgtc aagggcgtgg gggaggggag ggtcggaggg atgaaggatg acctaaatat 960
tattgttgag tgatagaggg ttattcaact atccgacccg tcgattttga tggatatgta 1020
aatttgtgtg tcatttgttt gatggattta gtaaaggTta tgggtctaga ggtgattttt 1080
gttgggtggg ttttacagag tttaaactag cggattatat agtggtatag aagatatagt 1140
tttattagaa catctccaaa atgtgactcg aaataatacc cccaaaattt aaaatactac 1200
atcattttga taaaaaaggt aaagtagagc actgTtTgaa cagtttttaa aagttgtgcc 1260
ctatatttta aaatagggtg ctgattttaa atattgttgt gggggataga tatccccggg 1320
tccactagaa ggcgagaagg cctcgcgtgt ggccacgggc cagttacccc gcaaggccat 1380

cccttcgtgg	gtcgagctag	aattactggt	agaatgggct	gaccgaagaa	ggcaacagac	1440
tcgagcccaa	acaatccatc	ggctcgtgcg	ctatccacag	aaactacccg	actttccggc	1500
gcatggcatc	ctagaatatc	ggggcgtatt	agggatgagt	cagcgagatt	ttcggagat	1560
tagttcagtt	tgttcgctat	tatttaggag	acatatgac	ctcatgtacg	tatggagtgc	1620
cccacggtcg	tgtatataag	gtccagaggg	taccccatca	tttctatcga	ccatctacct	1680
atctcatcag	cttttctcca	ttcaggagac	ctcgcttgta	acccaccaca	tatagatcca	1740
tcccaagaag	tagtgtatta	cgcctctcta	agcggcccaa	acttgcagaa	aaccgcctat	1800
ccctctctcg	tgcgctccagc	acgaaccatt	gagttacaat	caacagcacc	gtaccttgaa	1860
gcggaataca	atgaaggtta	gctacgattt	acagcaaagc	cagaatacaa	tgaaccataa	1920
agtgattgaa	gctcgaaata	tacgaaggaa	caaataTTTT	taaaaaata	cgcaatgact	1980
tggaacaaaa	gaaagtgata	tattttttgt	tcttaaacia	gcatccctc	taaagaatgg	2040
cagttttcct	ttgcatgtaa	ctattatgct	cccttcgtta	caaaaatttt	ggactactat	2100
tggaacttc	ttctgaaaat	agtggccacc	gcttaattaa	ggcgcgccat	gcccgggcaa	2160
gcggccgctt	aattaaattt	aaatgtttta	actaggaaat	ccaagcttgc	atgcctgcag	2220
atccccgggg	atcctctaga	gtcgacctgc	agtgcagcgt	gacccggtcg	tgccccctctc	2280
tagagataat	gagcattgca	tgtctaagtt	ataaaaaatt	accacatatt	ttttttgtca	2340
cacttgtttg	aagtgcagtt	tatctatctt	tatacatata	tttaaaacttt	actctacgaa	2400
taatataatc	tatagtacta	caataatatc	agtgttttag	agaatcatat	aaatgaacag	2460
ttagacatgg	tctaaaggac	aattgagtat	tttgacaaca	ggactctaca	gttttatctt	2520
tttagtgtgc	atgtgttctc	cttttttttt	gcaaatagct	tcacctatat	aatacttcat	2580
ccattttatt	agtacatcca	tttagggttt	agggttaatg	gtttttatag	actaattttt	2640
ttagtacatc	tattttattc	tatttttagcc	tctaaattaa	gaaaactaaa	actctatttt	2700
agttttttta	tttaatagtt	tagatataaa	atagaataaa	ataaagtgac	taaaaattaa	2760
acaaataccc	tttaagaaat	taaaaaaact	aaggaaacat	ttttcttggt	tcgagtagat	2820
aatgccagcc	tgttaaacgc	cgtcgacgag	tctaacggac	accaaccagc	gaaccagcag	2880
cgtcgcgtcg	ggccaagcga	agcagacggc	acggcatctc	tgtcgtgcc	tctggacccc	2940
tctcgagagt	tccgctccac	cgttggactt	gctccgctgt	cggcatccag	aaattgcgtg	3000
gcggagcggc	agacgtgagc	cggcacggca	ggcggcctcc	tcctcctctc	acggcaccgg	3060
cagctacggg	ggattccttt	cccaccgctc	cttcgctttc	ccttcctcgc	ccgccgtaat	3120
aaatagacac	cccctccaca	ccctctttcc	ccaacctcgt	gttgttcgga	gcgcacacac	3180
acacaaccag	atctccccc	aatccacccg	tcggcacctc	cgcttcaagg	tacgccgctc	3240
gtcctcccc	ccccccccc	tctctacctt	ctctagatcg	gcgttccggg	ccatgcatgg	3300
ttagggccc	gtagttctac	ttctgttcat	gtttgtgtta	gatccgtggt	tgtgttagat	3360
ccgtgctgct	agcgttcgta	cacggatgcg	acctgtacgt	cagacacggt	ctgattgcta	3420

acttgccagt gtttctcttt ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga	3480
tcgatttcat gatttttttt gtttcgttgc atagggtttg gtttgccctt ttcctttatt	3540
tcaatatatg ccgtgcactt gtttgtcggg tcatcttttc atgctttttt ttgtcttggt	3600
tgtgatgatg tggcttggtt gggcggtcgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac	3660
tacctggtgg atttattaat tttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttac	3720
gaattgaaga tgatggatgg aaatatcgat ctaggatagg tatacatggt gatgcggggt	3780
ttactgatgc atatacagag atgctttttg ttcgcttggt tgtgatgatg tgggttggtt	3840
gggcggtcgt tcattcgttc tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat	3900
ttattaattt tggaactgta tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg	3960
gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata	4020
catgatggca tatgcagcat ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa	4080
taaacaagta tgttttataa ttatttcgat cttagatatac ttggatgatg gcatatgcag	4140
cagctatatg tggatttttt tagccctgcc ttcatacgct atttatttgc ttggtactgt	4200
ttcttttgtc gatgctcacc ctgttggttg gtgttacttc tgcagggtac ccccggggtc	4260
gaccatggct catgctgccc tcagccctct ctcccaacgc tttgagagaa tagctgtcca	4320
gccactcact ggtgtccttg gtgctgagat cactggagtg gacttgaggg aaccacttga	4380
tgacagcacc tggaatgaga tattggatgc ctccacact taccaagtca tctactttcc	4440
tggccaagca atcaccaatg agcagcacat tgcattctca agaaggtttg gaccagttga	4500
tccagtgcct cttctcaaga gcattgaagg ctatccagag gttcagatga tccgcagaga	4560
agccaatgag tctggaaggg tgattggtga tgactggcac acagactcca ctttccttga	4620
tgcacctcca gctgctgttg tgatgagggc catagatggt cctgagcatg gcggagacac	4680
tgggttcctt tcaatgtaca cagcttgga gaccttgtct ccaaccatgc aagccaccat	4740
cgaagggtc aacgttgtgc actctgccac acgtgtgttc ggttccctct accaagcaca	4800
gaaccgtcgc ttcagcaaca cctcagtcaa ggtgatggat gttgatgctg gtgacagaga	4860
gacagtccat cccttggttg tgactcatcc tggctctgga aggaaaggcc tttatgtgaa	4920
tcaagtctac tgtcagagaa ttgagggcat gacagatgca gaatcaaagc cattgcttca	4980
gttcctctat gagcatgcca ccagatttga cttcacttgc cgtgtgaggt ggaagaaaga	5040
ccaagtcctt gtctgggaca acttggtgcac catgcaccgt gctgttcctg actatgctgg	5100
caagttcaga tacttgactc gcaccacagt tgggtggagt aggcctgccc gctgagtagt	5160
tagcttaatc acctagagct cgtttaaact gagggcactg aagtcgcttg acgtgctgaa	5220
ttgtttgtga tgttggtggc gtattttgtt taaataagta agcatggctg tgattttatc	5280
atatgatcga tctttgggtt tttatttaac acattgtaaa atgtgtatct attaataact	5340
caatgtataa gatgtgttca ttcttcggtt gccatagatc tgcttatttg acctgtgatg	5400

ttttgactcc	aaaaaccaa	atcacaactc	aataaactca	tggaatatgt	ccacctgttt	5460
cttgaagagt	tcatctacca	ttccagttgg	catttatcag	tgttgcagcg	gcgctgtgct	5520
ttgtaacata	acaattgtta	cggcatatat	ccaatagcgg	cggcctcct	gcagggttta	5580
aacttgccgt	ggcctatfff	cagaagaagt	tccaatagt	agtccaaaat	ttttgtaacg	5640
aaggggagcat	aatagttaca	tgcaaaggaa	aactgccatt	cttttagagg	gatgcttggt	5700
taagaacaaa	aaatatatca	ctttcttttg	ttccaagtca	ttgcgtatff	ttttaaaaat	5760
atttgttcct	tcgtatatff	cgagcttcaa	tcactttatg	gttctttgta	ttctggctff	5820
gctgtaaatc	gtagctaacc	ttcttcctag	cagaaattat	taataacttg	gatatfffff	5880
tagaatcaag	taaattacat	attaccacca	catcgagctg	cttttaaatt	catattacag	5940
ccatataggc	ttgattcatt	ttgcaaaatt	tccaggatat	tgacaacggt	aacttaataa	6000
tatcttgaaa	tattaaagct	attatgatta	ggggtgcaaa	tggaaccgag	tggttcgggt	6060
tatatcaaaa	tcaaaccaa	ccaactatat	cggtttgat	tggttcgggt	ttgccgggt	6120
ttcagcattt	tctggttfff	tttttgttag	atgaatatta	ttttaatctt	actttgtcaa	6180
atffttgata	agtaaataa	tgtgttagta	aaaattaatt	ttfftttaca	acatatgatc	6240
tattaaaata	ttcttatagg	agaattttct	taataacaca	tgatatttat	ttatfftagt	6300
cgtttgacta	atffttcggt	gatgtacact	ttcaaagtta	accaaattta	gtaattaagt	6360
ataaaaatca	atatgatacc	taaataatga	tatgttctat	ttaatfftaa	attatcgaaa	6420
tttcacttca	aattcgaaaa	agatatataa	gaattttgat	agattttgac	atatgaatat	6480
ggaagaacaa	agagattgac	gcattfftagt	aacacttgat	aagaaagtga	tcgtacaacc	6540
aattatfftaa	agttaataaa	aatggagcac	ttcatatffa	acgaaatatt	acatgccaga	6600
agagtcgcaa	atattffctag	atattffftta	aagaaaattc	tataaaaagt	cttaaaggca	6660
tatatataaa	aactatatat	ttatattfftt	tacccaaaag	caccgcaagg	ggtagccctg	6720
gggtgtcgga	cggactctaa	acaccgacag	ctggcgcgcc	aggtaggggg	tgtgtctffg	6780
atctgagcta	gctcaatgac	cattacctcc	aaatgcaaga	tcgcccttcg	ccccgggact	6840
atgtfftgct	ttggaaccat	ctcatccata	gcagatgaag	agggaaactct	gcaccgcata	6900
gcagatctat	tggaagaaga	gctffctctca	gaaatctcga	ggggagccag	ggcagaacag	6960
cgggtggcac	catcacccgc	acctcaagcg	aagatgacct	cttacaacc	gaaagtcggg	7020
agctcaccta	cccgaaaaac	tccgctgtcc	acttcgccca	caaaggagtg	gacacggatt	7080
actcgaaaga	aggaagcgag	tgtcccgagt	caggggacgg	gaacacgcca	agccatctff	7140
ccgacgcctt	cgcctcaaa	tgaggatgga	aagaagagcg	ccatcgcgct	ggctcctfftc	7200
taccccgacg	tcctcttcat	cagggggaga	ttggagttag	caccgctctt	caacgatgag	7260
ccaaccatgc	aaggggaaga	gcctccccag	cgtgaggcgc	gacgacggag	gaatagaagc	7320
cagaacgtgc	ggcgacatca	cgaggctggg	gaacgggatc	cggcgcaacc	cgtatccccg	7380
gacgaagctt	tagaagtagg	aaaaactccc	gacgagtggg	tacaccgaga	aaggcggaac	7440

tctcgccgcc gtgatcgccg acaagcttag gaccgagaac gagagcaagc cgagcaaggt 7500
gcaaggctgc gccgagagaa tgctctcttt gctcggaacc tgtaccccga cttcgctcgt 7560
gcaatgaaca cgccgagtga agtcggaggg gtactggccc agatagctga cggcctcccg 7620
cgaaccctag acacggaagg ctaccggcgg ctgcttactc gagcagttaa tcaccttcta 7680
cccatcacta atcctccaag cgacctacgc catgccatca acagccggcg agacacgcgg 7740
agctccatca acgcttcgcg cgaccgatga cacgaaagtg agatagggaa ccgagaggag 7800
tatgtccgag atcatgccat cctggcatga agtcatgcca cccgagctga gtcggttgcg 7860
gcctcgacca gtgtcccgtt ccagggacga tcaagatgac acacaactgg ctccccctct 7920
tgggaccgac ctcacgaacg ccgacatgaa gacacgtgcg gagtcttcgc acttactccg 7980
tgtctccggg ccatccagtg gcccctaact tcaaggtctc caacgtcagc aagtatgagc 8040
gcaagcagga cctgggtggc tggttagcca tctacacgat tgtcacatgg gccgccggag 8100
cgacggagga cgtgatgaca gtgtattttc ccattgtcct agggcaagac gcaatgcagt 8160
ggctccgaca tctaccccaa cattgcatag acaattggag cgacttcagt tggtgcttca 8220
tcgccaactt ccagtccttc ttgacaagc cggcgagcc atgggaccta aaatccattg 8280
ggcatcaggg cgatgaaacg ctccggttgt acctcaagag gtttttagacc atgaggaacc 8340
acacccccga agtcgccgag gcgggggtga ttgaagactt ctaccgagga tccaatgact 8400
cggctttcgt ccgagccata ctccagaaaa gcgtcggcca cctccgaaca cttgttccgg 8460
gaggcagacc tctacatcac cacgattaa cgggccagg acctcatcgg aggcacgaaa 8520
gccgcgccac acgcgccacg gtgtgacacg aaccagc 8557

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de evento delantero

<400> 2
attctggctt tgctgtaaatt cgt 23

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de evento inverso

<400> 3
ttacaatcaa cagcaccgta cctt 24

<210> 4
<211> 19
<212> ADN

55

<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	sonda de evento	
<400>	4	
	ctaaccttca ttgtattcc	19
<210>	5	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	cebador delantero de referencia	
<400>	5	
	tggcggacga cgacttgt	18
<210>	6	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	cebador inverso de referencia	
<400>	6	
	aaagtttgga ggctgccgt	19
<210>	7	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	sonda de referencia	
<400>	7	
	cgagcagacc gccgtgtact tctacc	26
<210>	8	
<211>	73	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	amplicón de evento	
<400>	8	
	ttacaatcaa cagcaccgta ccttgaagcg gaatacaatg aaggtagct acgatttaca	60
	gcaaagccag aat	73
<210>	9	
<211>	79	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	amplicón de referencia	

<400> 9

tggcggacga cgacttgtcc gagcagaccg ccgtgtactt ctacctgctc aagggcacgg60

acggcagcct ccaaacttt79

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

- 5 1. Un método para la determinación de la cigosidad de una planta de maíz que comprende un evento de maíz AAD-1 DAS-40278-9, donde dicho evento comprende una construcción de transgén que comprende un gen AAD-1, donde dicha construcción de transgén está flanqueada por un ADN genómico de maíz flanqueante 5' y un ADN genómico de maíz flanqueante 3'; donde dicho
10 método comprende:
 - la obtención de una muestra de ADN de ADN genómico de dicha planta de maíz;
 - la producción de una muestra de contacto, mediante el contacto de dicha muestra de ADN con:
 - 15 a. un primer cebador de evento y un segundo cebador de evento, donde dicho primer cebador de evento se une específicamente a dicha construcción de transgén; dicho segundo cebador de evento se une específicamente a dicho ADN flanqueante genómico de maíz 5' o dicho ADN
20 flanqueante genómico de maíz 3'; y donde dicho primer cebador de evento y dicho segundo cebador de evento producen un amplicón de evento cuando se someten a las condiciones de PCR TAQMAN;
 - b. un cebador delantero de referencia y un cebador inverso de referencia que producen un amplicón de referencia a partir de un gen de referencia de maíz endógeno cuando se somete a las condiciones de PCR
25 TAQMAN;
 - c. una sonda de evento fluorescente que hibrida con dicho amplicón de evento;

d. una sonda de referencia fluorescente que hibrida con dicho amplicón de referencia;

el sometimiento de dicha muestra de contacto a condiciones de PCR TAQMAN de criterio de valoración sobre la base de la fluorescencia;

5 la cuantificación de dicha sonda de evento fluorescente hibridada a dicho amplicón de evento;

la cuantificación de dicha sonda de referencia fluorescente hibridada a dicho amplicón de referencia;

10 la comparación de las cantidades de sonda de evento fluorescente hibridada con sonda de referencia fluorescente hibridada; y

la determinación de la cigosidad de DAS-40278-9, mediante la comparación de las relaciones de fluorescencia de sonda de evento fluorescente hibridada y sonda de referencia fluorescente hibridada.

15 2. El método de la reivindicación 1, donde dichos amplicones consisten en 50-100 residuos.

3. El método de la reivindicación 1, donde dicho ADN flanqueante 5' comprende los residuos 1-1873 de SEC. ID. NRO.: 29, y dicho ADN flanqueante 3' comprende los residuos 6690-8557 de SEC. ID. NRO.: 29.

20 4. El método de la reivindicación 1, donde dicha construcción de transgén consiste en los residuos 1874-6689 de SEC. ID. NRO.: 29.

5. El método de la reivindicación 1, donde dicho gen de referencia es un gen de invertasa endógeno de *Zea mays*.

25 6. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo cebador de evento se une a los residuos 1673-1873 de SEC. ID. NRO.: 29, o su complemento.

7. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo cebador de evento se une a los residuos 6690-6890 de SEC. ID. NRO.: 29.

8. El método de la reivindicación 1, donde dicho método se usa para la introgresión de cultivo, del evento en otra línea de maíz.
9. El método de la reivindicación 8, donde dicha otra línea de maíz carece de dicho evento.
- 5 10. El método de la reivindicación 1, donde dicho amplicón de evento es de 73 pares de bases.
11. El método de la reivindicación 1, donde dicho gen de referencia comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NRO.: 5, SEC. ID. NRO.: 6 y SEC. ID. NRO.: 7, o hibrida con ella.
- 10 12. El método de la reivindicación 1, donde dichos cebadores de referencia comprenden SEC. ID. NRO.: 5 y SEC. ID. NRO.: 6, y dicha sonda de referencia comprende SEC. ID. NRO.: 7.
13. El método de la reivindicación 1, donde dichas sondas están marcadas con un colorante fluorescente y un apagador.
- 15 14. El método de la reivindicación 13, donde dicha sonda de evento comprende FAM como dicho colorante fluorescente, en el extremo 5' de dicha sonda de evento, y un apagador MGB, en el extremo 3' de dicha sonda de evento.
15. El método de la reivindicación 1, donde dicho amplicón de referencia es un fragmento de 79 pares de bases amplificado por dichos cebadores.
- 20 16. El método de la reivindicación 13, donde dicha sonda de referencia está marcada con HEX en el extremo 5' de dicha sonda de referencia, y un apagador Black Hole Quencher 2 (BHQ2), en el extremo 3' de dicha sonda de referencia.
17. El método de la reivindicación 1, donde dicho amplicón de evento consiste en SEC. ID. NRO.: 8, y dicho amplicón de referencia consiste en SEC. ID. NRO.: 9.
- 25 18. El método de la reivindicación 1, donde dicha sonda de evento

comprende SEC. ID. NRO.: 4.

19. El método de la reivindicación 1, donde dichos cebadores de evento se seleccionan del grupo que consiste en SEC. ID. NRO.: 2 y SEC. ID. NRO.: 3.

20. El método de la reivindicación 1, donde los resultados de dicho
5 método se leen directamente en un lector de placa.

21. El método de la reivindicación 1, donde dicha muestra de ADN se obtiene de una planta de maíz en un campo.

22. Un equipo para llevar a cabo el método de la reivindicación 1, donde dicho equipo comprende dicho primer cebador de evento, dicho segundo cebador
10 de evento, dicho cebador delantero de referencia, dicho cebador inverso de referencia, dicha sonda de evento y dicha sonda de referencia.

23. El equipo de la reivindicación 22, donde dichos cebadores de evento consiste en SEC. ID. NRO.: 2 y SEC. ID. NRO.: 3; dichos cebadores de referencia consisten en SEC. ID. NRO.: 5 y SEC. ID. NRO.: 6; dicha sonda de evento
15 consiste en SEC. ID. NRO.: 4; y dicha sonda de referencia consiste en SEC. ID. NRO.: 7:

p. de: DOW AGROSCIENCES LLC

RESUMEN

Esta invención se refiere, en parte, a la detección de plantas tolerantes a herbicidas –más específicamente, un evento de transformación *aad-1* en plantas de maíz. La presente invención además proporciona ensayos para la detección de la presencia del presente evento en una muestra (por ejemplo, de grano de maíz). Asimismo, se proveen equipos y condiciones útiles para llevar a cabo los ensayos. La presente invención se refiere además, en parte, al cultivo de plantas usando los presentes métodos. En algunas realizaciones, dicho evento/secuencia de polinucleótidos puede “acumularse” con otros rasgos. Más específicamente, la invención se refiere, en parte, a un ensayo de PCR TaqMan de criterio de valoración para la detección del evento de maíz AAD-1 40278-9. Algunas realizaciones se dirigen a ensayos capaces del análisis de cigosidad de alto rendimiento. La presente invención además se refiere, en parte, al uso de un gen de referencia preferido para la utilización en la determinación de la cigosidad.

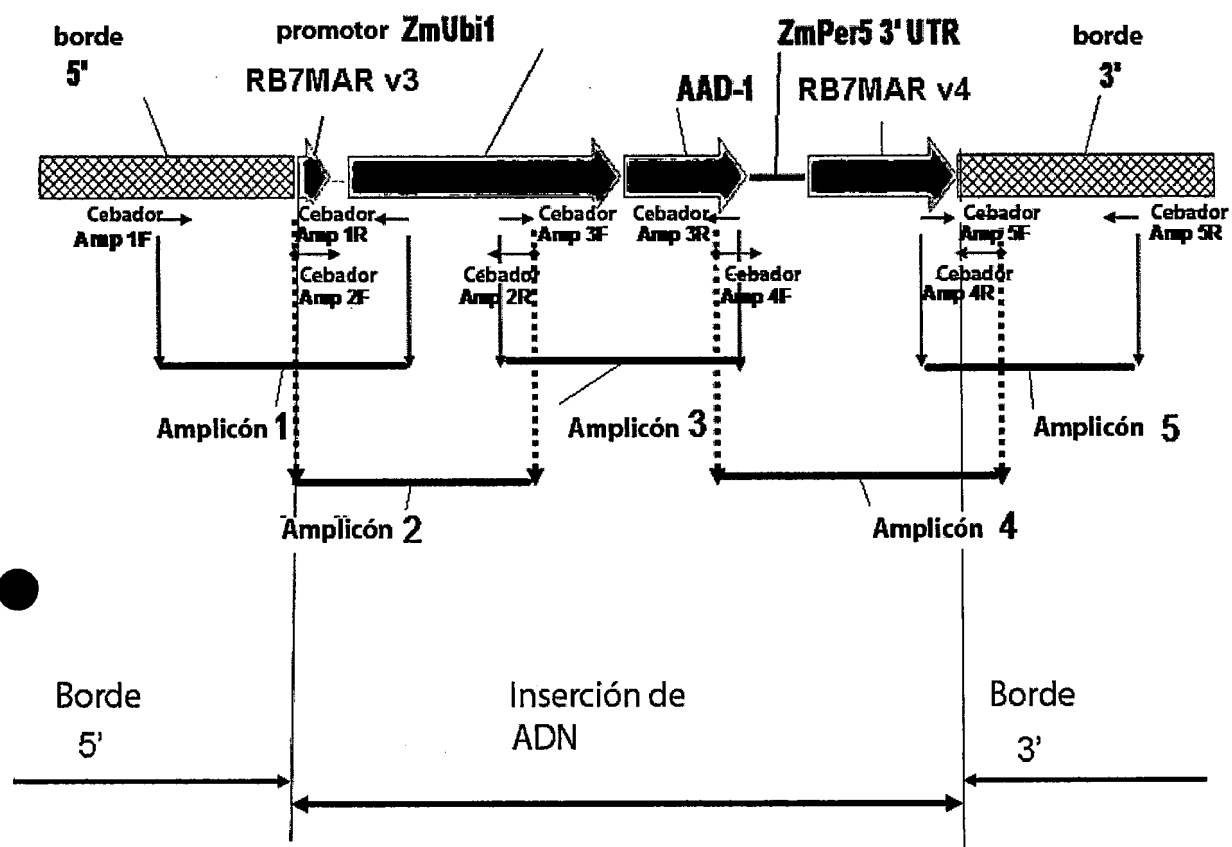


Figura 1. Estrategia de clonación para la inserción de ADN en el Evento de Maíz DAS-40278-9.

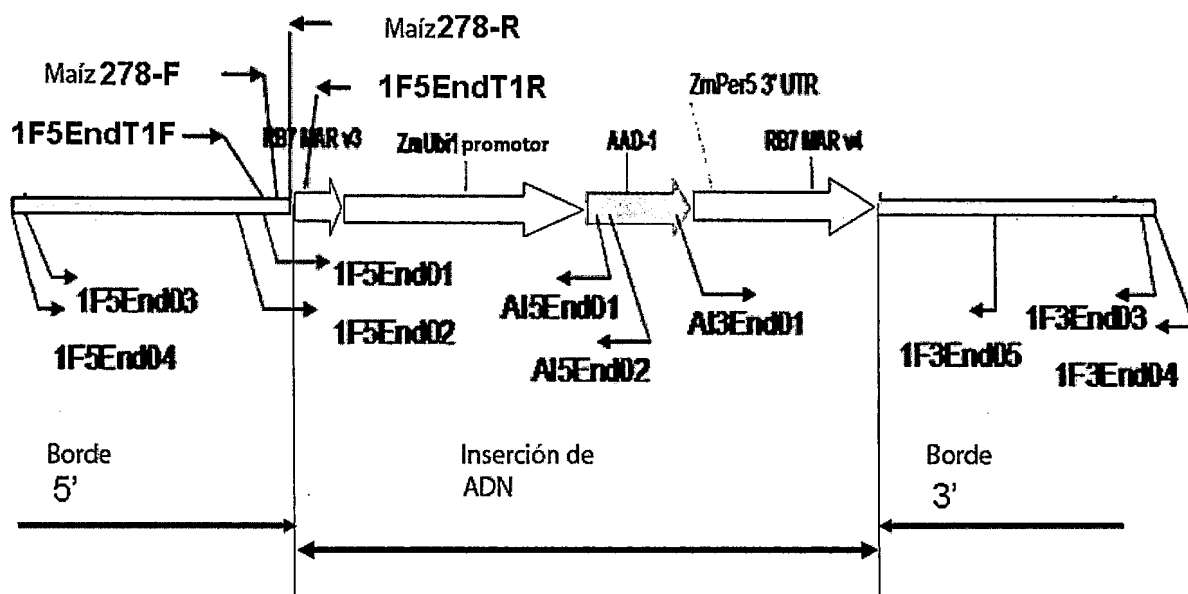


Figura 2. Diagrama de los cebadores utilizados en la amplificación de PCR para la confirmación de las regiones de borde flanqueantes del Evento de maíz DAS-40278-9. El diagrama esquemático representa las ubicaciones de cebador para la confirmación del secuenciamiento de longitud completa del evento de maíz de AAD-1 DAS-40278-9 de bordes 5' a 3'.

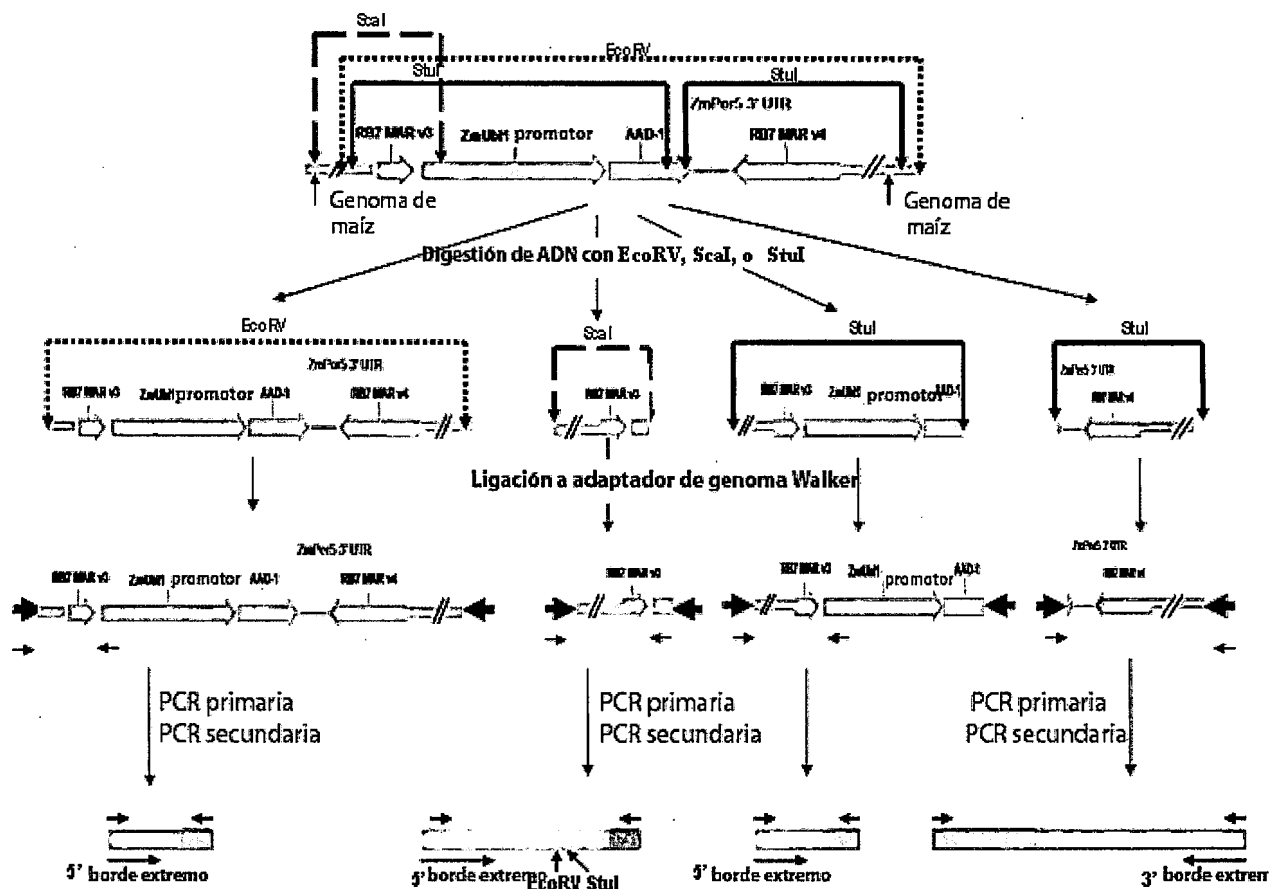


Figura 3. Estrategia de clonación para las secuencias de borde flanqueantes del Evento de maíz DAS-40278-9. El ADN genómico del Evento de maíz DAS-40278-9 fue digerido con *EcoR* V, *Stu* I, o *Sca* I y genotecas generadas correspondientes GenomeWalker™, que se usaron como patrones para la amplificación de las secuencias de ADN blanco.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/45871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68, C12P 19/34 (2010.01) USPC - 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC 435/6												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ), Google Scholar(DAS-40278-9, AAD-1 TAQMAN, aryloxyalkanoate dioxygenase TAQMAN, zygoty corn genomic flanking TAQMAN, zygoty corn TAQMAN, zygoty maize genomic flanking TAQMAN, zygoty maize TAQMAN, FAM MGB quencher advantage, HEX Black Hole Quencher 2 advantage taqman)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y — A	GERMAN et al., A rapid method for the analysis of zygoty in transgenic plants. Plant Science, February 2003, vol 164, no 2, pp 183-187; pg 184, 2.1. Plant material and segregation analysis; 2.2. DNA extraction and PCR reactions; pg 184-185, 2.3. Primers and probes for real-time PCR; pg 185, 2.4. Quantitative real-time PCR reactions; pg 186, left col para 2-3, right col para 1	1-2, 5, 8-16, 20-22 ----- 17-19, 23										
Y — A	YANG et al., Event Specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Genetically Modified MON863 Maize Based on the 5'-Transgene Integration Sequence. J Agric Food Chem, 30 November 2005, vol 53, no 24, pp 9312-9318; abstract; pg 9313, Table 1; pg 9313-9314, Oligonucleotide Primers and Probes.; pg 9315, fig 1	1-2, 5, 8-16, 20-22 ----- 17-19, 23										
Y — A	US 2009/0093366 A1 (WRIGHT et al.) 9 April 2009 (09.04.2009); para [0106], [0324]-[0326], [0339], [0349]; Table 22	1-2, 5, 8-16, 20-22 ----- 17-19, 23										
Y — A	BRODMANN et al., Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL, May-June 2002, vol 85, no 3, pp 646-653; abstract; pg 647, fig 1; pg 648, Oligonucleotide Primers and Probes, PCR Conditions, Results and Discussion, Table 2	5, 11-12, 15 ----- 23										
Y	SYLVAIN et al., Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan probe. Journal of Immunological Methods, April 2004, vol 287, no 1-2, pp 179-186; abstract; 181, Table 1	14										
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐												
* Special categories of cited documents: <table><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 9 October 2010 (09.10.2010)		Date of mailing of the international search report 01 NOV 2010										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/45871

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/45871

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☒ Claims Nos.: 3-4 and 6-7 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: CRF submitted by the applicant only contained SEQ ID Nos: 1-9. Accordingly, claims directed at SEQ ID NO:29 are unsearchable. 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/45871

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOTSCH et al., Nuclease-Resistant Single-Stranded DNA Controls for Nucleic Acid Amplification Assays. J Clin Microbiol, August 2007, vol 45, no 8, pp 2570?2574; pg 2571, right col, para 3	16
Y	APPLIED BIOSYSTEMS, ABI PRISM 7000 Sequence Detection System and Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Created 2007. [online], [retrieved on 8 October 2010 (08.10.2010)]. Retrieved from the Internet <URL: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generalidocuments/cms_039287.pdf >; pg 1, purpose; pg 3, row 9	20
A	US 2007/0089201 A1 (BRIGGS et al.), 19 April 2007 (19.04.2007); SEQ ID NO: 16	17
A	GenBank Accession No ZMU16123, Created 16 December 1995 (16.12.1995). [online], [retrieved on 6 October 2010 (06.10.2010)]. Retrieved from the Internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1122438 >	17
A	GenBank Accession No AC133634, Created 22 November 2002 (22.11.2002). [online], [retrieved on 6 October 2010 (06.10.2010)]. Retrieved from the Internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/25167187 >	18, 23
A	GenBank Accession No DV681892, Created 17 May 2006 (17.05.2006). [online], [retrieved on 9 October 2010 (06.10.2010)]. Retrieved from the Internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/82455291 >	19, 23
A	US 2002/0073448 A1 (MICHALOWSKI et al), 13 June 2002 (13.06.2002); SEQ ID NO: 20	19, 23

 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:		(51) Int Cl:	C12Q 001/068
22) Fecha de solicitud:		(71)Solicitante(s)	DOW AGROSCIENCES LLC
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/235,248	19/08/2009	
	61/237,366	23/04/2010	
		(72) Inventor(es)	YUNXING CORY CUI Y OTROS
		(74) Apoderado:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional:		19/03/2012
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		
	Fecha de presentación de la solicitud:		18/08/2010
	No. de solicitud PCT/US2010/045871		
(87)	Publicación internacional		
	Fecha:		24/02/2011
	N° publicación:		WO 2011/022471 A1
(54) Titulo: DETECCIÓN DEL EVENTO DAS-40278-9 DE AAD-1			

Resumen:

Esta invención se refiere, en parte, a la detección de plantas tolerantes a herbicidas –más específicamente, un evento de transformación *aad-1* en plantas de maíz. La presente invención además proporciona ensayos para la detección de la presencia del presente evento en una muestra (por ejemplo, de grano de maíz). Asimismo, se proveen equipos y condiciones útiles para llevar a cabo los ensayos. La presente invención se refiere además, en parte, al cultivo de plantas usando los presentes métodos. En algunas realizaciones, dicho evento/secuencia de polinucleótidos puede “acumularse” con otros rasgos. Más específicamente, la invención se refiere, en parte, a un ensayo de PCR TaqMan de criterio de valoración para la detección del evento de maíz AAD-1 40278-9. Algunas realizaciones se dirigen a ensayos capaces del análisis de cigosidad de alto rendimiento. La presente invención además se refiere, en parte, al uso de un gen de referencia preferido para la utilización en la determinación de la cigosidad.

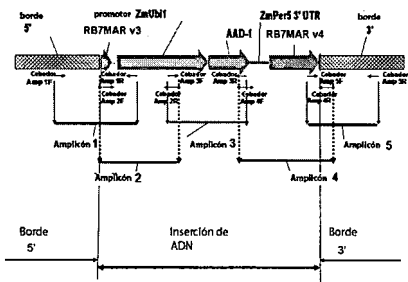


Figura 1. Estrategia de clonación para la inserción de ADN en el Evento de Maíz DAS-40278-9

Sobre

con

Artes

7/20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0016618

Bogotá D.C., Febrero 20 de 2012 - 08:02:40

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716554	17/02/2012	38.708.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***.

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-039002- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

C/O: 10975-841-087-1

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 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 20 de 2012 - 08:02:48

7271

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0013869	
				Bogotá D.C., Febrero 13 de 2012 - 07:43:05	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716532	10/02/2012	38.590.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1611 TASA ANUAL A#OS 4 a 8 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE DE	310.000.00	310.000.00	
				\$310.000.00	
=====					
SON: **TRESCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____ _*****_ Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-039002- -00000-0000 Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 75					
Q/b: 10975-841-087-1					
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 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Febrero 13 de 2012 - 07:43:14					

28
73

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

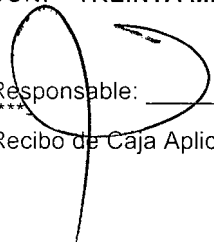
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0016547
		Bogotá D.C., Febrero 20 de 2012 - 08:02:40

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716554	17/02/2012	38.708.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
			\$30.000.00
=====			

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-039002- -00000-0000
Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

Colo: 10975-841-087-1

7423

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0016548
		Bogotá D.C., Febrero 20 de 2012 - 08:02:40

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716554	17/02/2012	38.708.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
			\$30.000.00
=====			

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-039002- -00000-0000
Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

Ce/o: 10975 - 841-087 - 1

75/84

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 006214
		Bogotá D.C., Enero 23 de 2012 - 07:49:39

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	127712240	20/01/2012	45.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00 20.000.00
			\$20.000.00
=====			

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-039002- -00000-0000
Fecha: 2012-03-06 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

Cob: 10975-841-087-1



No. 12-039002- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:08:35

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 75

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐

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 INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

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 ☐