



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y CUMPLIDO

Radicación: 65656937 00000000

Folios: 165

Indicación

Fecha (PMD): 2003-09-08 17:31:31

Tramite: 011 PCT-PATENT S/P FASE NPLI 411 PRESENTAL

Dependencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 12-09-05

SOLICITUD DE

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del estado de Delaware, Estados
Unidos de América

Dirección 800 N Lindbergh Boulevard
St Louis, Missouri 63167
Estados Unidos de América

Domicilio St Louis, Missoun
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C

☐

NIT

☐

C.E

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre **EMILIO FERRERO**
Dirección Carrera 4ª No 72-35
Teléfono 347 36 11
Fax 211 86 50
E-mail clientes@camyp.com
Domicilio Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438 019 T.P 31 929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Eric R. CERNY**
1141 Richland Drive
Chesterfield, Missouri 63017
Estados Unidos de América
3. **Jessee L. HART**
7382 Pershing Avenue# 2W
St Louis, Missouri 63130
Estados Unidos de América
5. **Rachel L. KREIB**
282 S 9TH Street
Wood River, Illinois 62095
Estados Unidos de América
7. **Amy B. MARTENS**
9225 Kit Drive
St Louis, Missouri 63123
Estados Unidos de América

2. **Can DUONG**
2030 Brown Road
St. Louis, Missouri 63114
Estados Unidos de América
4. **Scott A. HUBER**
681 Hidden Path Apt D
Creve Coeur, Missouri 63141
Estados Unidos de América
6. **Jennifer J. LISTELLO**
6 Cherrywood Parc Court
O'Fallon, Missouri 63366
Estados Unidos de América
8. **Bernard SAMMONS**
380 Lafayette Court
Ellisville, Missouri 63011
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/US2004/002907

Fecha: 2 de Febrero 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/072235 A2

Fecha: 26 de Agosto 2004

6

Título (54)

EVENTO DE ALGODÓN MON 88913 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA SU
DETECCIÓN

7

Clasificación Internacional (51) C12N

6182 ; C12Q 1/68

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

12/02/2003

(31) Número de Solicitud

60/447,184

9

Comprobante de pago No.: 05-63.061

Fecha: 22/08/2005

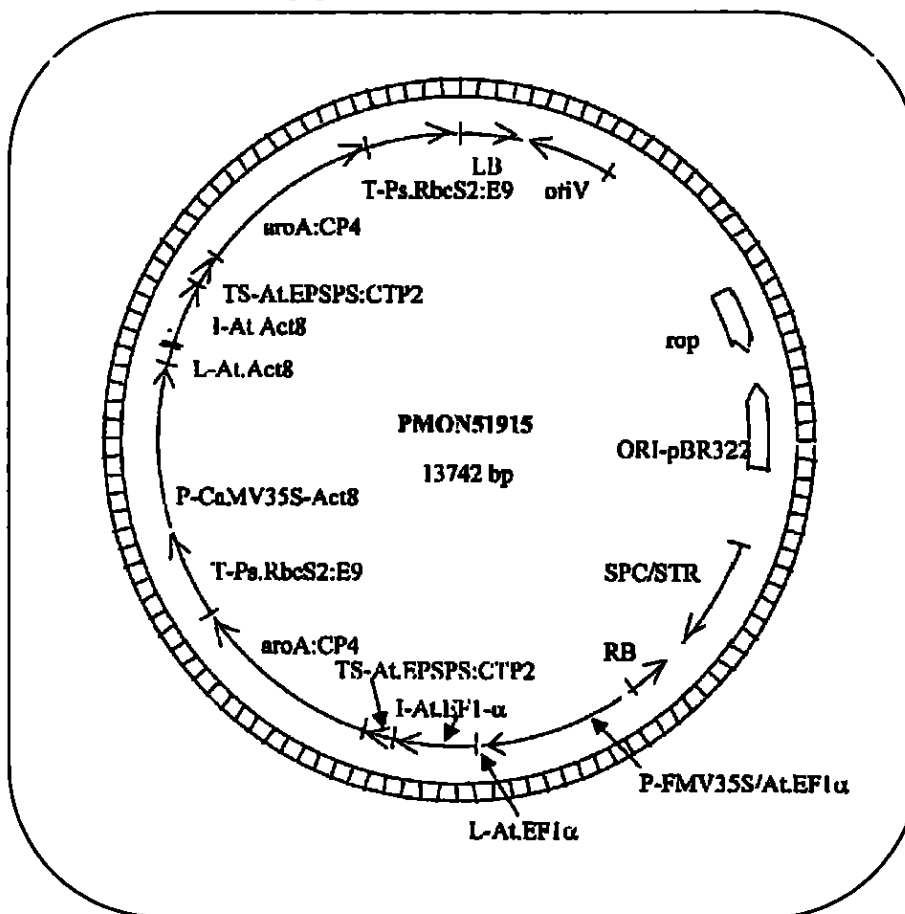
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443 000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA con anexos
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA con anexos
- ☐ 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

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/072235 A2**

Descripción:

Páginas 31 en el idioma original

Páginas 39 en español

Reivindicaciones: Número (s) 19

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☐ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☒ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☐ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:

9. ☐ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☒ **Forma PCT/IB/311 Notification Concerning Transmittal of Copy of International Application as Published or Republished**
11. ☐ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
12. ☐ **FORMA PCT/IB/345. Communication in cases for which no other form is applicable.**

13. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
16. ☒ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional con anexos.**
17. ☒ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
18. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
19. ☒ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
20. ☒ **Extracto de publicación.**

12946
6324
4

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

- This public document
2. has been signed by JUDITH A LORENZ
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of JUDITH A LORENZ-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 29th. day of MAY, 2001
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 63157
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm 48 (12-2000)

TRADUCCION No: 1506/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Español - Inglés
No 2879 Min Justicia

29 AGO 2005

PABLO PINOEL CARRAS
NOTARIO (E)

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

12746

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

MONSANTO TECHNOLOGY LLC

domiciliado (s) en/or **800 North Lindbergh**

Boulevard, St. Louis, Missouri 63167,
United States of America,

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa 31929, GONZALO PERDOMO, tpa 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa 832, 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 tomara su lugar. Cuando

sare 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, nombres de dominio, 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 y judicial, nulidad, 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

in due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa 31929; GONZALO PERDOMO, tpa 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, 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 first or second alternates in their turn, or both of them, 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 grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Courts in all matters concerning 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, domain names, 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 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

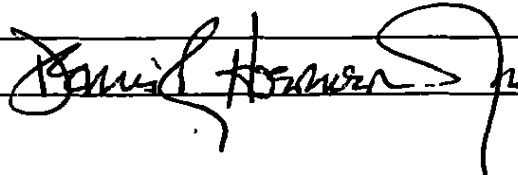
estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos

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

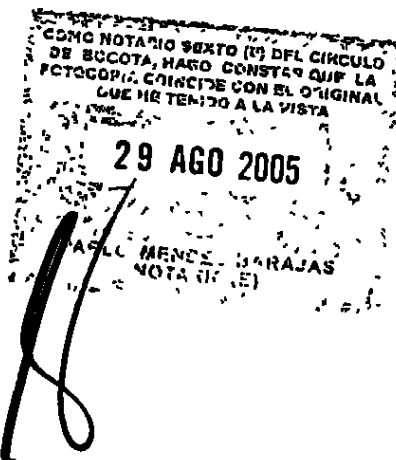
Dado y firmado hoy/Given and signed this 21st day of May, 2001

en/in St Louis, MO

por/by Dennis R. Hoerner, Jr.

Firma  Signature

TRADUCCION No. 1506101
MARIA ELVIRA MARTÍNEZ
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No 2879 Min Justicia



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de _____
compareció(eron) personalmente _____

On this _____ day of _____
200 _____ before me, a Notary Public or Attesting Official of _____
personally appeared _____

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

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

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy 18 de Mayo de 200 1
Compareció(eron) ante mí
Dennis R. Hoerner, Jr.
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este
documento en representación de la Sociedad/compañía
denominada MONSANTO TECHNOLOGY LLC

On this 18th day of May 200 1
appeared before me
Dennis R. Hoerner, Jr.
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico

I certify.

1 Que he visto los siguientes documentos *

Acción de Miembro Unico, firmado en
Saint Louis, Missouri el 15/03/2001

1 That I have seen the following documents.*

ACTION OF SOLE MEMBER, SIGNED IN
ST. LOUIS? MISSOURI ON MARCH 15, 2001

2 Que dichos documentos prueban lo siguiente.

2. That the above documents duly prove the following

2.1 Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

2.1. That MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América.

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America.

2.2 Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167, Estados
Unidos de América.

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167, United
States of America.

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

2.3 That the purpose or purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the 20 AGO 2005 of the mentioned
Corporation/Company

2.4 Que el(los) Sr (Sres) Dennis R. Hoerner Jr,
Presidente.
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder

2.4 That Mr (Messrs) Dennis R. Hoerner Jr,
President
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

Ciudad St Louis

City St. Louis

Estado Missouri, USA

State Missouri US

Hoy 18 de Mayo de 200 1

This 18th day of May 200 1

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

JUDITH A. CORNEZ
Notary Public - State of Missouri
St. Louis County
My Commission Expires November 20, 2003

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country

This public document

2. has been signed by

3. acting in the capacity of

4 bears the seal/stamp of

Certified

5. at

6 the

7. by

8. No

9. Seal/stamp

10. Signature

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO
DE NOTARIA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
28 AGO 2005
PABLO MENDEZ SARAJAS
NOTARIO (E)

7

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15.06/01 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación, Ratificación y Poder escrito en inglés y español, por el cual **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER**). Dado y firmado el 21 de mayo de 2001 en St. Louis, MO, por Dennis R. Hoerner, Jr. (Firma ilegible).

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**. Dado en la ciudad de St. Louis, Estado de Missouri, el 18 de mayo de 2001. (Firma) Judith A. Lorenz, Notario Público. (Sello notarial en tinta) JUDITH A. LORENZ, Notario Público, Estado de Missouri, Condado de St. Louis, Mi comisión expira el 20 de noviembre de 2003. (Sello seco de Judith A. Lorenz)

APOSTILLA

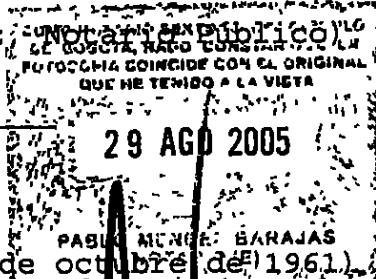
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. Ha sido firmado por JUDITH A. LORENZ

3. Actuando en su capacidad de NOTARIO PÚBLICO



4. Lleva el sello/timbre de JUDITH A. LORENZ, NOTARIO PÚBLICO,
ESTADO DE MISSOURI

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri.
6. el 29 de mayo de 2001
7. Por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri.
8. No. 63157.
9. Sello: Sello del Secretario de Estado, Missouri.
10. Firma: (Firma) Matt Blunt.

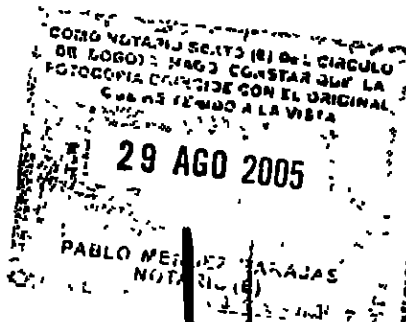
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta
oficina para su confrontación.

WPC 12746-801-001-3

ID 3

JUN 12/01

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No: 1506/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Ingles
Res. No 2879 Min Justicia



CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

JEFE DE LEGATIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

2001 JUN 12 4:40

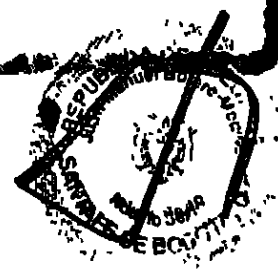
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

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

IDENTIFICADOS CON C.G. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 12 JUN. 2001



COMO NOTARIO SEXTO (S) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL

29 AGO 2005

PABLO NE... NOTARIO

EXHIBICION DE REFACTORES

3 5 1 1 1

COPIA LITOGRAFADA
COPIA LITOGRAFADA
COPIA LITOGRAFADA

COPIA LITOGRAFADA
COPIA LITOGRAFADA
COPIA LITOGRAFADA



The State of Texas

**Secretary of State
APOSTILLE**

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. **Country:** **United States of America**

This public document

2. **has been signed by** **MANUELA CABRAL FLY**

3. **acting in the capacity of** **Notary Public, State of Texas**

4. **and bears the seal/stamp of** **MANUELA CABRAL FLY, Notary Public,
State of Texas, Commission Expires: 09-18-07**

CERTIFIED

5. **at Austin, Texas**

6. **on August 5, 2005**

7. **by the Secretary of State of Texas**

8. **Certificate No. N-482187**

9. **Seal**

10. **Signature:**



A handwritten signature in black ink, reading "Roger Williams".

**Roger Williams
Secretary of State
ST/lb**

110

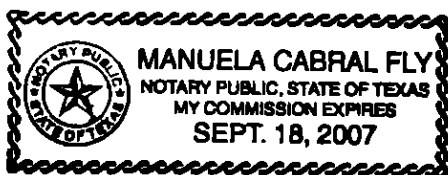
I, Kim A. Erickson, hereby certify the attached copy is a true and correct copy of the original Assignment executed on the 14th, 16th, 19th, and 26th days of July 2004. The inventors signed the original document on behalf of Monsanto Technology LLC regarding any and all patent applications entitled "COTTON EVENT MON 88913 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF".

Signature: Kim Erickson
Name: Kim A. Erickson
Date: August 4, 2005

County of Harris)
State of Texas) ss:

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 4th day of August, 2005, personally appeared, Kim A. Erickson known to me to be the person whose name is subscribed in the preceding paragraph, and acknowledged to me that she executed the same of her own free will for the purposes of fulfilling requirements of legalization of photocopies of the attached Assignment.

Subscribed and sworn to before me a notary public on this 4th day of August, 2005.



Manuela Cabral Fly
Notary Public

My commission expires: September 18, 2007

[SEAL]

ASSIGNMENT

FOR GOOD AND VALUABLE CONSIDERATION, the receipt, sufficiency and adequacy of which are hereby acknowledged, the undersigned, do hereby:

SELL, ASSIGN AND TRANSFER to Monsanto Technology LLC (the "Assignee"), a corporation of the state of Delaware, having a place of business at 800 N. Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, the entire right, title and interest for the United States and all foreign countries in and to any and all improvements which are disclosed in the PROVISIONAL application for United States Letters Patent, Serial No. 60/447,184, which has been filed on February 12, 2003, and is entitled "COTTON EVENT MON 88913 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF," and also PCT application PCT/US2004/002907, which has been filed on February 2, 2004, and is entitled "COTTON EVENT MON 88913 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF," such application and all divisional, continuing, substitute, renewal, reissue and all other applications for patent which have been or shall be filed in the United States and all foreign countries on any of such improvements; all original and reissued patents which have been or shall be issued in the United States and all foreign countries on such improvements; and specifically including the right to file foreign applications under the provisions of any convention or treaty and claim priority based on such application in the United States;

AUTHORIZE AND REQUEST the issuing authority to issue any and all United States and foreign patents granted on such improvements to the Assignee;

WARRANT AND COVENANT that no assignment, grant, mortgage, license or other agreement affecting the rights and property herein conveyed has been or will be made to others by the undersigned, and that the full right to convey the same as herein expressed is possessed by the undersigned;

COVENANT, when requested and at the expense of the Assignee, to carry out in good faith the intent and purpose of this assignment, the undersigned will execute all divisional, continuing, substitute, renewal, reissue, and all other patent applications on any and all such improvements; execute all rightful oaths, declarations, assignments, powers of attorney and other papers; communicate to the Assignee all facts known to the undersigned relating to such improvements and the history thereof; and generally do everything possible which the Assignee shall consider desirable for vesting title to such improvements in the Assignee, and for securing, maintaining and enforcing proper patent protection for such improvements;

TO BE BINDING on the heirs, assigns, representatives and successors of the undersigned and extend to the successors, assigns and nominees of the Assignee.

Signature: R. Eric Cerny
Name: R. Eric Cerny

Date: 7/14/04

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF St. Louis)

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 16th day of July, 2004, personally appeared R. Eric Cerny, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]



Darla Gault Gallagher
Notary or Consular Officer

Signature: _____
Name: Can Duong

Date: _____

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF _____)

BEFORE ME, the undersigned authority, on this ____ day of _____, 2004, personally appeared Can Duong, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]

Notary or Consular Officer

TO BE BINDING on the heirs, assigns, representatives and successors of the undersigned and extend to the successors, assigns and nominees of the Assignee.

Signature: _____ Date: _____
Name: R. Eric Cerny

STATE OF MISSOURI)
COUNTY OF _____) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this ____ day of _____, 2004, personally appeared R. Eric Cerny, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Notary or Consular Officer

[SEAL]

Signature: Can Duong Date: 07/19/2004
Name: Can Duong

STATE OF MISSOURI)
COUNTY OF St. Louis) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 19th day of July, 2004, personally appeared Can Duong, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Marcia M. Barrett
Notary or Consular Officer

[SEAL]

MARCIA M. BARRETT
NOTARY PUBLIC—STATE OF MISSOURI
MY COMMISSION EXPIRES OCT. 9, 2005
ST LOUIS COUNTY

Assignment – 11899.0239.00PC00

14

Signature: Jesse L. Hart
Name: Jesse L. Hart

Date: 7/16/2004

STATE OF MISSOURI)
COUNTY OF St. Louis) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 16 day of July, 2004, personally appeared Jesse L. Hart, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]



Darla Gault Gallagher
Notary or Consular Officer

Signature: _____
Name: Scott A. Huber

Date: _____

STATE OF MISSOURI)
COUNTY OF _____) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this ____ day of _____, 2004, personally appeared Scott A. Huber, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]

Notary or Consular Officer

Signature: _____
Name: Jesse L. Hart

Date: _____

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF _____)

BEFORE ME, the undersigned authority, on this ____ day of _____, 2004, personally appeared Jesse L. Hart, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Notary or Consular Officer

[SEAL]

Signature: Scott A. Huber
Name: Scott A. Huber

Date: 7/14/04

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF St. Louis)

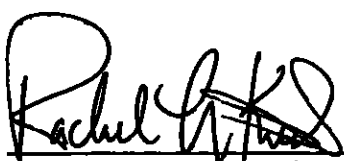
BEFORE ME, the undersigned authority, on this 14 day of July, 2004, personally appeared Scott A. Huber, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI
MY COMMISSION EXPIRES MARCH 8, 2008
ST. LOUIS COUNTY

Notary or Consular Officer

[SEAL]

Assignment - 11899.0239.00PC00

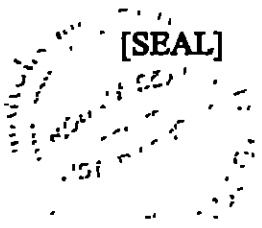
Signature: 
Name: Rachel L. Kreib

Date: 07-19-04

STATE OF ILLINOIS)
COUNTY OF St. Louis) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 19th day of July, 2004, personally appeared Rachel L. Kreib, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that she executed the same of her own free will for the purposes and consideration therein expressed.


Notary or Consular Officer



[SEAL]

MARCIA M BARRETT
NOTARY PUBLIC—STATE OF MISSOURI
MY COMMISSION EXPIRES OCT. 9, 2005
ST. LOUIS COUNTY

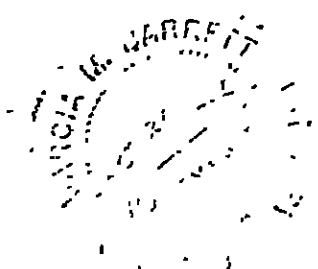
Signature: 
Name: Jennifer J. Listello

Date: 07-19-04

STATE OF MISSOURI)
COUNTY OF St. Louis) ss.

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 19th day of July, 2004, personally appeared Jennifer J. Listello, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that she executed the same of her own free will for the purposes and consideration therein expressed.


Notary or Consular Officer



[SEAL]

MARCIA M BARRETT
NOTARY PUBLIC—STATE OF MISSOURI
MY COMMISSION EXPIRES OCT 9, 2005
ST. LOUIS COUNTY

Assignment – 11899.0239.00PC00

17

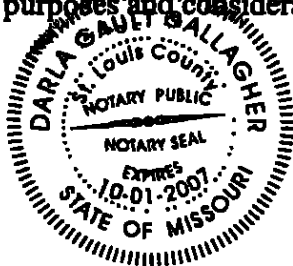
Signature: Amy Martens
Name: Amy B. Martens

Date: 7-26-04

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF St. Louis)

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 26 day of July, 2004, personally appeared Amy B. Martens, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that she executed the same of her own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]



Darla Gault Gallagher
Notary or Consular Officer

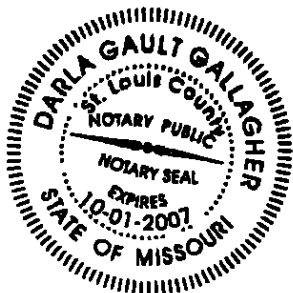
Signature: Bernard Sammons
Name: Bernard Sammons

Date: 7-22-04

STATE OF MISSOURI)
) ss.
COUNTY OF St. Louis)

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 22nd day of July, 2004, personally appeared Bernard Sammons, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he executed the same of his own free will for the purposes and consideration therein expressed.

[SEAL]



Darla Gault Gallagher
Notary or Consular Officer

Assignment - 11899.0239.00PC00

18

TRADUCCIÓN OFICIAL No 08.24/05b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

EXPEDIENTE NO. 11899.0239.OOPC00
38-21(53182)A PCT

CESIÓN

POR CONTRAPRESTACIÓN LEGAL Y VÁLIDA, cuyo recibo, suficiencia e idoneidad se reconoce por el presente, los suscritos por el presente:

VENDEN, CEDEN Y TRANSFIEREN a Monsanto Technology LLC (el "Cesionario") una sociedad constituida de conformidad con las leyes de Delaware y domiciliada en 800 N. Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, todo el derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países extranjeros en y todos los perfeccionamientos que se divulgan en la solicitud PROVISIONAL de patente de los Estados Unidos con Número de Serie 60/447,184, la cual se presentó el 12 de febrero de 2003 y que se titula "EVENTO DE ALGODÓN MON 88913 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN" así como a la solicitud PCT no. PCT/US2004/002907, la cual se presentó el 2 de febrero de 2004 y se titula "EVENTO DE ALGODÓN MON 88913 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN", a dicha solicitud y todas las solicitudes de división, continuación, sustitución, renovación, nueva publicación y todas las demás solicitudes de patente que se hayan presentado o se presenten en los Estados Unidos y en todos los países extranjeros en relación con cualquiera de dichos perfeccionamientos; a todas las patentes originales o nuevas publicaciones de las mismas que se hayan o se otorguen en el futuro en los Estados Unidos y en todos los países extranjeros a dichos perfeccionamientos, y específicamente se incluye el derecho a presentar solicitudes en el extranjero en concordancia con las

disposiciones de cualquier convención o tratado y a reivindicar prioridad con fundamento en dicha solicitud en los Estados Unidos;

AUTORIZAMOS Y SOLICITAMOS a la autoridad otorgante para que expida cualquier y todas las patentes de los Estados Unidos y extranjeras en relación con dichos perfeccionamiento a nombre del Cesionario;

GARANTIZAMOS Y CONVENIMOS que no se ha realizado, ni se realizará, ninguna cesión, donación, hipoteca, licencia u otro acuerdo que afecte los derechos y la propiedad traspasada por el presente en favor de terceros por parte de los suscritos y que los suscritos poseen el pleno derecho para traspasar los mismos como se expresa en el presente;

SE ACUERDA que cuando el Cesionario les solicite y por cuenta del mismo, con el fin de ejecutar de buena fe el espíritu y objeto de esta cesión, los suscritos celebrarán todas las solicitudes de división, continuación, sustitución, renovación, nueva publicación y todas las demás solicitudes en relación con cualquier y todos los mencionados perfeccionamientos; celebrarán todos los juramentos legales, declaraciones, cesiones, poderes y otros documentos, comunicarán al Cesionario todos los hechos de conocimiento de los suscritos en relación con dichos perfeccionamientos y la historia de los mismos y en general realizar todo aquellos que esté a su alcance y que el Cesionario considere conveniente para investir la titularidad de dichos perfeccionamientos al Cesionario y para obtener, mantener y hacer cumplir la debida protección de patente a dichos perfeccionamientos;

PARA QUE SEA OBLIGANTE en sus herederos, cesionarios, representantes y sucesores de los suscritos y para que se extienda a los sucesores, cesionarios y nominatarios del Cesionario.

20

Firma: Firma Ilegible
Nombre: R. Eric Cerny

Fecha: 7/16/04

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St.Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 16 de Julio de 2004, compareció personalmente R. Eric Cerny, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mí que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

[SELLO] Sello Firma Ilegible
 Notarial Notario o Funcionario Consular

Firma: Firma Ilegible
Nombre: Can Duong

Fecha: 07/19/04

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St.Louis)

ANTE MÍ, la suscrita autoridad, hoy 19 de Julio de 2004, compareció personalmente Cang Duong, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mí que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

[SELLO] Firma Ilegible
 Notario o Funcionario Consular

MARCIA M. BARRETT
NOTARIO PÚBLICO - ESTADO DE MISSOURI
MI COMISIÓN VENCE OCT. 9 2005
CONDADO DE ST. LOUIS

Firma: Firma Ilegible
Nombre: Jesse L. Hart

Fecha: 7/16/04

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St.Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 16 de Julio de 2004, compareció personalmente Jesse L. Hart, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mi que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

Firma Ilegible
Notario o Funcionario Consular

[SELLO] Sello
 Notarial

Firma: Firma Ilegible Fecha: 7/14/04
Nombre: Scott A. Huber

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St. Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 14 de Julio de 2004, compareció personalmente Scott A. Huber, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mi que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

Firma Ilegible
Notario o Funcionario Consular

[SELLO]

JOYCE E. TUNSTALL
NOTARIO PÚBLICO - ESTADO DE MISSOURI
MI COMISIÓN VENCE MARZO 8 DE 2008
CONDADO DE ST LOUIS

Firma: Firma Ilegible Fecha: 07-19-04
Nombre: Rachel L. Kreib

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St. Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 19 de Julio de 2004, compareció personalmente Rachel L. Kreib, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mi que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

Firma Ilegible

Notario o Funcionario Consular

[SELLO]

MARCIA M. BARRETT
NOTARIO PÚBLICO - ESTADO DE MISSOURI
MI COMISIÓN VENCE OCT. 9 2005
CONDADO DE ST. LOUIS

Firma: Firma Ilegible Fecha: 07-19-04
Nombre: Jennifer J. Listello

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St.Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 19 de Julio de 2004, compareció personalmente Jennifer J. Listello, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mi que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

Firma Ilegible
Notario o Funcionario Consular

[SELLO]

MARCIA M. BARRETT
NOTARIO PÚBLICO - ESTADO DE MISSOURI
MI COMISIÓN VENCE OCT. 9 2005
CONDADO DE ST. LOUIS

Firma: Firma Ilegible Fecha: 7-26-04
Nombre: Amy B. Martens

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St.Louis)

ANTE Mí, la suscrita autoridad, hoy 26 de Julio de 2004, compareció personalmente Amy B. Martens, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mi que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

Firma Ilegible
Notario o Funcionario Consular

Sello
[SELLO] Notarial

Firma: Firma Ilegible Fecha: 7-22-04
Nombre: Bernard Sammons

ESTADO DE MISSOURI)
) Declaración Juramentada
CONDADO DE St. Louis)

ANTE MÍ, la suscrita autoridad, hoy 22 de Julio de 2004, compareció personalmente Bernard Sammons, a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior documento y quién reconoció ante mí que él suscribió el mismo por voluntad propia para los fines y por la contraprestación expresada en el mismo.

[SELLO] Sello Firma Ilegible
 Notarial Notario o Funcionario Consular

Yo, Kim A. Erickson, por el presente certifico que la adjunta copia es una copia fiel y exacta de la Cesión original suscrita los días 14, 16, 19 y 26 de julio de 2004. Los inventores firmaron el documento original en representación de Monsanto Technology LLC en relación con cualquier y todas las solicitudes de patente tituladas "EVENTO DE ALGODÓN MON 88913 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN".

Firma: Firma Ilegible
Nombre: Kim A. Erickson
Fecha: 4 de Agosto de 2005

Condado de Harris)
) Declaración Juramentada
Estado de Texas)

ANTE MÍ, la suscrita autoridad, compareció hoy 4 de Agosto de 2005 Kim A. Erickson a quién conozco como la persona cuyo nombre se suscribe en al párrafo anterior y reconoció ante mí que ella suscribió el mismo por voluntad propia con el fin de cumplir con los requisitos de legalización de las fotocopias de la Cesión adjunta.

Suscrito y juramentado ante mí, notario público, hoy 4 de Agosto de 2005.

MANUELA CABRAL FLY
NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE TEXAS

Firma Ilegible

Mí comisión vence: Septiembre 18 de 2007

[SELLO]



El Estado de Texas

Secretario de Estado

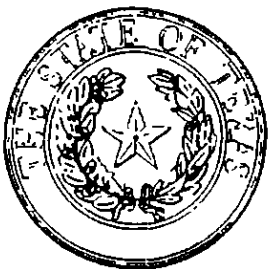
APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 Octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por MANUELA CABRAL FLY
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de Texas
4. y lleva el sello/estampilla de MANUELA CABRAL FLY, Notario Público,
Estado de Texas, Comisión Vence: 09-18-07

CERTIFICADO

5. en Austin, Texas 6. el 5 de Agosto de 2005
7. por el Secretario del Estado de Texas
8. Certificado No. N-482187 ✓
9. Sello/estampilla 10. Firma



Firma Ilegible
Roger Williams
Secretario de Estado
ST/lb

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-7018/WPCL002G/COLO 12746-841-001-3

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO EN SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LMS, FIRMA(S) DE
Diego Felipe Vargas
Zamora
CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL SELLO EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA
24 AGO 2005



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 AUG 24 P 2:36

LCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

1509072
Diego Vargas
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 August 2004 (26.08.2004)

PCT

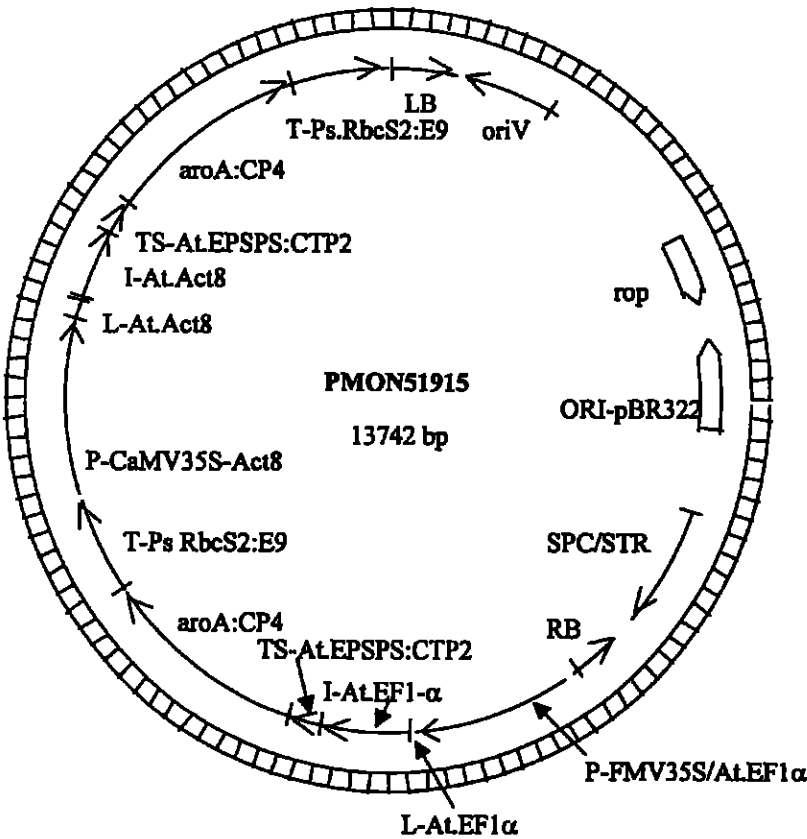
(10) International Publication Number
WO 2004/072235 A2

- (51) International Patent Classification?: C12N
- (21) International Application Number:
PCT/US2004/002907
- (22) International Filing Date: 2 February 2004 (02 02 2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/447,184 12 February 2003 (12 02 2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MON-SANTO TECHNOLOGY LLC [US/US], 800 N. Lindbergh Boulevard, St Louis, MO 63167 (US)
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CERNY, R., Eric

- [US/US], 1141 Richland Drive, Cheterfield, MO 63017 (US) DUONG, Can [US/US], 2030 Brown Road, St. Louis, MO 63114 (US). HART, Jesse, L. [US/US], 7382 Pershing Avenue #2W, St Louis, MO 63130 (US) HUBER, Scott, A. [US/US], 681 Hidden Path Apt D, Creve Coeur, MO 63141 (US) KRIEB, Rachel, L. [US/US], 282 S 9th Street, Wood River, IL 62095 (US). LISTELLO, Jennifer, J. [US/US], 6 Cherrywood Parc Court, O'Fallon, MO 63366 (US) MARTENS, Amy, B. [US/US], 9225 Kit Drive, St Louis, MO 63123 (US) SAMMONS, Bernard [US/US], 380 Lafayette Court, Ellhsville, MO 63011 (US)
- (74) Agent: KAMMERER, Patricia, A., Howrey Simon Arnold & White, LLP, 750 Bereng Drive, Houston, TX 77057-2198 (US)
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Continued on next page]

(54) Title: COTTON EVENT MON 88913 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF



(57) Abstract: The present invention provides a cotton plant event MON 88913 compositions and seed. Also provided are assays for detecting the presence of the cotton plant event MON 88913 based on a DNA sequence and the use of this DNA sequence as a molecular marker in a DNA detection method.

WO 2004/072235 A2

WO 2004/072235 A2

KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW

GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, LZ, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

- 1 -

COTTON EVENT MON 88913 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

[0001] This application claims benefit of U.S. Provisional Application No. 60/447,184, filed February 12, 2003, the entire contents of which are incorporated by reference herein.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to the field of plant molecular biology. More specifically, the invention relates to a glyphosate tolerant cotton event MON 88913 and to assays and methods for detecting the presence of cotton event MON 88913 DNA in a plant sample and compositions thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Cotton is an important fiber crop in many areas of the world. The methods of biotechnology have been applied to cotton for improvement of the agronomic traits and the quality of the product. The method of introducing transgenes into cotton plants has been demonstrated in U.S. Patent No. 5,004,863. One such agronomic trait important in cotton production is herbicide tolerance, in particular, tolerance to glyphosate herbicide. This trait has been introduced into cotton plants and is a successful product now used in cotton production. The current commercial Roundup Ready® cotton event (1445) provides excellent tolerance to glyphosate, the active ingredient in Roundup®, through the four-leaf stage (Nida *et al.*, J. Agric. Food Chem. 44:1960-1966, 1996; Nida *et al.*, J. Agric. Food Chem. 44:1967-1974, 1996). However, foliar application beyond the four-leaf stage must be limited due to insufficient tolerance in male reproductive tissues in certain environmental conditions. This lack of male reproductive tolerance appears to be a result of insufficient CP4 EPSPS expression in critical tissues, higher sensitivity of these tissues to glyphosate, and accumulation of high amounts of glyphosate in these strong sink tissues (Pline *et al.*, Weed Sci. 50:438-447, 2002). There is a need for a cotton plant more highly glyphosate tolerant than Roundup Ready® cotton 1445.

[0004] It would be advantageous to be able to detect the presence of a particular event in order to determine whether the progeny of a sexual cross contain a transgene of interest. In addition, a method for detecting a particular event would be helpful for complying with regulations requiring pre-market approval or labeling of foods derived from recombinant crop

~~2~~

plants, for example. It is possible to detect the presence of a transgene by any well known nucleic acid detection method such as the polymerase chain reaction (PCR) or DNA hybridization using nucleic acid probes. These detection methods generally focus on frequently used genetic elements, such as promoters, 3' transcription terminators, marker genes, etc. As a result, such methods may not be useful for discriminating between different events, particularly those produced using the same DNA construct unless the sequence of genomic chromosomal DNA adjacent to the inserted DNA ("flanking genomic DNA") is known. Event-specific DNA detection methods for a glyphosate tolerant cotton event 1445 have been described (US 20020120964, herein incorporated by reference in its entirety).

[0005] The present invention relates to a glyphosate tolerant cotton event MON 88913, compositions contained therein, and to the method for the detection of the transgene/genomic insertion region in cotton event MON 88913 and progeny thereof.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The present invention is related to the transgenic cotton event designated MON 88913 having seed deposited with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No. PTA-4854. Another aspect of the invention comprises the progeny plants, or seeds, or regenerable parts of the plants and seeds of the cotton event MON 88913. The invention also includes plant parts of cotton event MON 88913 that include, but are not limited to pollen, ovule, flowers, bolls, lint, shoots, roots, and leaves. The invention relates to a cotton plant having a glyphosate tolerant phenotype and the novel genetic compositions of MON 88913.

[0007] One aspect of the invention provides DNA compositions and methods for detecting the presence of a transgene/genomic junction region from cotton plant event MON 88913. Isolated DNA molecules are provided that comprise at least one transgene/genomic junction DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, and complements thereof, wherein the junction molecule spans the insertion site that comprises a heterologous DNA inserted into the cotton genome and the genomic DNA from the cotton cell flanking the insertion site in cotton event MON 88913. A cottonseed and plant material thereof comprising these molecules is an aspect of this invention.

[0008] An isolated novel DNA molecule is provided that is a 5'transgene/genomic region SEQ ID NO:3 or the complement thereof, wherein this DNA molecule is novel in cotton event

- 8 -

MON 88913. A cotton plant and seed comprising SEQ ID NO:3 in its genome is an aspect of this invention. According to another aspect of the invention, an isolated DNA molecule is provided that is a 3'transgene/genomic region SEQ ID NO:4, or the complement thereof, wherein this DNA molecule is novel in cotton event MON 88913. A cotton plant and seed comprising SEQ ID NO:4 in its genome is an aspect of this invention.

[0009] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA amplification method, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:3 and a DNA molecule of similar length of any portion of a 5' flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:3, where these DNA molecules when used together are useful as a DNA primer set in a DNA amplification method that produces an amplicon. The amplicon produced using the DNA primer set in the DNA amplification method is diagnostic for cotton event MON 88913. Any amplicon produced from MON 88913 DNA by DNA primers that are homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:3 is an aspect of the invention.

[0010] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA amplification method, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:4 and a DNA molecule of similar length of any portion of a 3' flanking cotton genomic DNA of SEQ ID NO:4, where these DNA molecules are useful as a DNA primer set in a DNA amplification method. The amplicon produced using the DNA primer set in the DNA amplification method is diagnostic for cotton event MON 88913. The amplicons produced from MON 88913 DNA by DNA primers that are homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:4 are an aspect of the invention.

[0011] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding specifically to the cotton event MON 88913 DNA in a sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the sample comprising DNA with a DNA primer set that, when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON 88913 produces an amplicon that is diagnostic for cotton event MON 88913

- 4 -

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon.

[0012] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding specifically to the cotton event MON 88913 DNA in a sample are provided. Such methods comprising: (a) contacting the sample comprising DNA with a DNA probe comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, that hybridize under stringent hybridization conditions with genomic DNA from cotton event MON 88913 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control cotton plant DNA; (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the cotton event MON 88913 DNA.

[0013] According to another aspect of the invention, methods of producing a cotton plant that tolerates application of glyphosate are provided that comprise the steps of: (a) sexually crossing a first parental cotton event MON 88913 comprising the expression cassettes of the present invention, which confers tolerance to application of glyphosate, and a second parental cotton plant that lacks the glyphosate tolerance, thereby producing a plurality of progeny plants; and (b) selecting a progeny plant that tolerates application of glyphosate. Such methods may optionally comprise the further step of backcrossing the progeny plant to the second parental cotton plant and selecting for glyphosate tolerant progeny to produce a true-breeding cotton variety that tolerates application of glyphosate.

[0014] According to another aspect of the invention, a method is provided for determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising: (a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, and SEQ ID NO:25 that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON 88913, produces a first amplicon that is diagnostic for cotton event MON 88913; and (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the first amplicon; and (c) and detecting the first amplicon; and (d) contacting the sample comprising cotton DNA with said primer set, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton plants produces a second amplicon comprising the native cotton genomic DNA homologous to the cotton genomic region of a transgene insertion identified as cotton event MON 88913; and (e) performing a

- 5 -

nucleic acid amplification reaction, thereby producing the second amplicon; and (f) and detecting the second amplicon; and (g) comparing the first and second amplicons in a sample, wherein the presence of both amplicons indicates the sample is heterozygous for the transgene insertion.

[0015] A method for determining zygosity comprising contacting a cotton DNA sample with using with primers and probes comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, and SEQ ID NO:25; using an endpoint Taqman® PCR condition; and detecting the amplicon products.

[0016] A method for controlling weeds in a crop or field of cotton event MON 88913 comprising the step of applying a herbicidally effective amount of glyphosate containing herbicide to the field of MON 88913 cotton.

[0017] The foregoing and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description and accompanying drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0018] Figure 1. Plasmid map of pMON51915.

[0019] Figure 2. Genomic organization of insert in cotton event MON 88913.

[0020] Figure 3. MON 88913 5' DNA junction sequence (SEQ ID NO:1) and 3' DNA junction sequence (SEQ ID NO:2).

[0021] Figure 4. MON 88913 5' transgene/genomic DNA region (SEQ ID NO:3).

[0022] Figure 5. MON 88913 3' transgene/genomic DNA region (SEQ ID NO:4).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0023] The present invention relates to a glyphosate tolerant cotton event MON 88913, compositions contained therein, and to the method for the detection of the transgene/genomic insertion region in cotton event MON 88913 and progeny thereof. The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms and abbreviations are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of common terms in molecular biology may also be found in Rieger *et al.*,

- 6 -

Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994. The nomenclature for DNA bases as set forth at 37 CFR § 1.822 is used.

[0024] As used herein, the term "cotton" means *Gossypium hirsutum* and includes all plant varieties that can be bred with cotton event MON 88913. The plant of the present invention is a cotton plant, more specifically the cotton plant MON 88913.

[0025] As used herein, the term "comprising" means "including but not limited to".

[0026] As used herein, the term "crop" refers to cultivated plants or parts of plants, such as are grown in a field, plot, row, greenhouse, flat, or container.

[0027] "Glyphosate" refers to N-phosphonomethylglycine and its salts. N-phosphonomethylglycine is a well-known herbicide that has activity on a broad spectrum of plant species. Glyphosate is the active ingredient of Roundup® (Monsanto Co.), a safe herbicide having a desirably short half-life in the environment. Glyphosate is the active ingredient of Roundup® herbicide (Monsanto Co.). Treatments with "glyphosate herbicide" refer to treatments with the Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® herbicide or any other herbicide formulation containing glyphosate. Examples of commercial formulations of glyphosate include, without restriction, those sold by Monsanto Company as ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® and ACCORD® herbicides, all of which contain glyphosate as its isopropylammonium salt; those sold by Monsanto Company as ROUNDUP® DRY and RIVAL® herbicides, which contain glyphosate as its ammonium salt; that sold by Monsanto Company as ROUNDUP® GEOFORCE, which contains glyphosate as its sodium salt; and that sold by Syngenta Crop Protection as TOUCHDOWN® herbicide, which contains glyphosate as its trimethylsulfonium salt. When applied to a plant surface, glyphosate moves systemically through the plant. Glyphosate is phytotoxic due to its inhibition of the shikimic acid pathway, which provides a precursor for the synthesis of aromatic amino acids. Glyphosate inhibits the enzyme 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase (EPSPS) found in plants. Glyphosate tolerance can be achieved by the expression of bacterial EPSPS variants and plant EPSPS variants that have lower affinity for glyphosate and therefore retain their catalytic

- 7 -

activity in the presence of glyphosate (U.S. Patent Nos. 5,633,435, 5,094,945, 4,535,060, and 6,040,497).

[0028] A transgenic "event" is produced by transformation of a plant cell with heterologous DNA, *e.g.*, a nucleic acid construct (pMON51915, Figure 1) that includes a transgene of interest; regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant cell, and selection of a particular plant characterized by insertion into a particular genome location. The term "event" refers to the original transformant plant and progeny of the transformant that include the heterologous DNA. The term "event" also includes progeny produced by a sexual outcross between the event and another plant that wherein the progeny includes the heterologous DNA. Even after repeated back-crossing to a recurrent parent, the inserted DNA and flanking genomic DNA from the transformed parent event is present in the progeny of the cross at the same chromosomal location. The term "event" also refers to DNA from the original transformant comprising the inserted DNA, and flanking genomic sequence immediately adjacent to the inserted DNA, that would be expected to be transferred to a progeny that receives the inserted DNA including the transgene of interest as the result of a sexual cross of one parental line that includes the inserted DNA (*e.g.*, the original transformant and progeny resulting from selfing) and a parental line that does not contain the inserted DNA.

[0029] The expression of foreign genes in plants is known to be influenced by their chromosomal position, perhaps due to chromatin structure (*e.g.*, heterochromatin) or the proximity of transcriptional regulation elements (*e.g.*, enhancers) close to the integration site (Weising *et al.*, Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988). For this reason, it is often necessary to screen a large number of events in order to identify an event characterized by optimal expression of a introduced gene of interest. For example, it has been observed in plants and in other organisms that there may be a wide variation in levels of expression of an introduced transgene among events. There may also be differences in spatial or temporal patterns of expression, for example, differences in the relative expression of a transgene in various plant tissues, that may not correspond to the patterns expected from transcriptional regulatory elements present in the introduced gene construct. For this reason, it is common to produce hundreds to thousands of different events and screen those events for a single event that has desired transgene expression

- 8 -

levels and patterns for commercial purposes. An event that has desired levels or patterns of transgene expression is useful for introgressing the transgene into other genetic backgrounds by sexual crossing using conventional breeding methods. Progeny of such crosses maintain the transgene expression characteristics of the original transformant. This strategy is used to ensure reliable gene expression in a number of varieties that are well adapted to local growing conditions and market demands.

[0030] A glyphosate tolerant cotton plant can be bred by first sexually crossing a first parental cotton plant, consisting of a cotton plant grown from the transgenic cotton plant cell derived from transformation with the plant expression cassettes contained in pMON51915 and that tolerates application of glyphosate herbicide, with a second parental cotton plant that lacks the tolerance to glyphosate herbicide, thereby producing a plurality of first progeny plants; and then selecting a first progeny plant that is tolerant to glyphosate herbicide; and selfing the first progeny plant, thereby producing a plurality of second progeny plants; and then selecting from the second progeny plants a glyphosate herbicide tolerant plant. These steps can further include the back-crossing of the first glyphosate tolerant progeny plant or the second glyphosate tolerant progeny plant to the second parental cotton plant or a third parental cotton plant, thereby producing a cotton plant that tolerates the application of glyphosate herbicide. In the present invention, the transgenic cotton plant is also defined as cotton event MON 88913 and may be referred to herein as MON 88913.

[0031] It is also to be understood that two different transgenic plants can also be mated to produce offspring that contain two independently segregating added, exogenous genes. Selfing of appropriate progeny can produce plants that are homozygous for both added, exogenous genes. Back-crossing to a parental plant and out-crossing with a non-transgenic plant are also contemplated, as is vegetative propagation. Descriptions of other breeding methods that are commonly used for different traits and crops can be found in one of several references, *e.g.*, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0032] A "probe" is an isolated nucleic acid to which is attached a conventional detectable label or reporter molecule, *e.g.*, a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. Such a probe is complementary to a strand of a target nucleic acid, in the case of the

- 9 -

present invention, to a strand of genomic DNA from MON 88913 whether from a MON 88913 plant or from a sample that includes MON 88913 DNA. Probes according to the present invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and can be used to detect the presence of that target DNA sequence.

[0033] DNA primers are isolated polynucleic acids that are annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, then extended along the target DNA strand by a polymerase, *e.g.*, a DNA polymerase. A DNA primer pair or a DNA primer set of the present invention refer to at least two DNA primer molecules useful for amplification of a target nucleic acid sequence, *e.g.*, by the polymerase chain reaction (PCR) or other conventional nucleic acid amplification methods.

[0034] Probes and primers are generally 11 polynucleotides or more in length, often 18 polynucleotides or more, 24 polynucleotides or more, or 30 polynucleotides or more. Such probes and primers are selected to be of sufficient length to hybridize specifically to a target sequence under high stringency hybridization conditions. Preferably, probes and primers according to the present invention have complete sequence similarity with the target sequence, although probes differing from the target sequence that retain the ability to hybridize to target sequences may be designed by conventional methods.

[0035] Methods for preparing and using probes and primers are described, for example, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (hereinafter, "Sambrook *et al.*, 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (with periodic updates) (hereinafter, "Ausubel *et al.*, 1992"); and Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. PCR DNA primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

[0036] Primers and probes based on the flanking genomic DNA and transgene insert sequences disclosed herein can be used to confirm (and, if necessary, to correct) the disclosed

- 10 -

DNA sequences by conventional methods, e.g., by isolation of genomic DNA from MON 88913, re-cloning the transgene/genomic regions and sequencing such DNA molecules.

[0037] The nucleic acid probes and primers of the present invention hybridize under stringent conditions to a target DNA molecule. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of DNA from a transgenic event in a sample. Polynucleic acid molecules or fragments thereof are capable of specifically hybridizing to other nucleic acid molecules under certain circumstances. As used herein, two polynucleic acid molecules are said to be capable of specifically hybridizing to one another if the two molecules are capable of forming an anti-parallel, double-stranded nucleic acid structure. A nucleic acid molecule is said to be the "complement" of another nucleic acid molecule if they exhibit complete complementarity. As used herein, molecules are said to exhibit "complete complementarity" when every nucleotide of one of the molecules is complementary to a nucleotide of the other. Two molecules are said to be "minimally complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under at least conventional "low-stringency" conditions. Similarly, the molecules are said to be "complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under conventional "high-stringency" conditions. Conventional stringency conditions are described by Sambrook *et al.*, 1989, and by Haymes *et al.*, In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985), Departures from complete complementarity are therefore permissible, as long as such departures do not completely preclude the capacity of the molecules to form a double-stranded structure. In order for a nucleic acid molecule to serve as a primer or probe it need only be sufficiently complementary in sequence to be able to form a stable double-stranded structure under the particular solvent and salt concentrations employed.

[0038] As used herein, a substantially homologous DNA sequence is the sequence of a DNA molecule that will specifically hybridize to the complement of a target DNA molecule to which it is being compared under high stringency conditions. Appropriate stringency conditions that promote DNA hybridization, for example, 6.0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by a wash of 2.0 x SSC at 50°C, are known to those skilled in the art or can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),

- 11 -

6.3.1-6.3.6. For example, the salt concentration in the wash step can be selected from a low stringency of about 2.0 x SSC at 50°C to a high stringency of about 0.2 x SSC at 50°C. In addition, the temperature in the wash step can be increased from low stringency conditions at room temperature, about 22°C, to high stringency conditions at about 65°C. Both temperature and salt may be varied, or either the temperature or the salt concentration may be held constant while the other variable is changed. In a preferred embodiment, a polynucleic acid of the present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO: 3 or 4, or complements thereof or fragments of either under moderately stringent conditions, for example at about 2.0 x SSC and about 65°C. In a particularly preferred embodiment, a nucleic acid of the present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO:3 or 4 or complements or fragments of either under high stringency conditions. In one aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention has the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 or 2 or complements thereof or fragments of either. In another aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares a substantial portion of its sequence identity with the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either, wherein the sequence identity is between 80% and 100% or 90% and 100%. In a further aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares between 95% and 100% sequence identity with the sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either. SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 may be used as markers in plant breeding methods to identify the progeny of genetic crosses similar to the methods described for simple sequence repeat DNA marker analysis, in "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, *et al.*, eds., Wiley-Liss NY; herein incorporated by reference in its entirety. The hybridization of the probe to the target DNA molecule can be detected by any number of methods known to those skilled in the art, these can include, but are not limited to, fluorescent tags, radioactive tags, antibody based tags, and chemiluminescent tags.

[0039] Regarding the amplification of a target nucleic acid sequence (*e.g.*, by PCR) using a particular amplification primer pair, "stringent conditions" are conditions that permit the

- 12 -

primer pair to hybridize only to the target nucleic acid sequence to which a primer having the corresponding wild-type sequence (or its complement) would bind and preferably to produce a unique amplification product, the amplicon, in a DNA thermal amplification reaction.

[0040] The term "specific for (a target sequence)" indicates that a probe or primer hybridizes under stringent hybridization conditions only to the target sequence in a sample comprising the target sequence.

[0041] As used herein, "amplified DNA" or "amplicon" refers to the product of polynucleic acid amplification method directed to a target polynucleic acid molecule that is part of a polynucleic acid template. For example, to determine whether a cotton plant resulting from a sexual cross contains transgenic event genomic DNA from the cotton event MON 88913 plant of the present invention, DNA that is extracted from a cotton plant tissue sample may be subjected to a polynucleic acid amplification method using a primer pair that includes a primer derived from DNA sequence in the genome of the MON 88913 plant adjacent to the insertion site of the inserted heterologous DNA (transgene DNA), and a second primer derived from the inserted heterologous DNA to produce an amplicon that is diagnostic for the presence of the MON 88913 event DNA. The diagnostic amplicon is of a length and has a DNA sequence that is also diagnostic for the event. The amplicon may range in length from the combined length of the primer pairs plus one nucleotide base pair, preferably plus about fifty nucleotide base pairs (bps), more preferably plus about two hundred-fifty nucleotide base pairs, and even more preferably plus about four hundred-fifty nucleotide base pairs or more. Alternatively, a primer pair can be derived from genomic sequence on both sides of the inserted heterologous DNA so as to produce an amplicon that includes the entire insert polynucleotide sequence (*e.g.*, a forward primer isolated from the genomic portion of SEQ ID NO:3 and a reverse primer isolated from the genomic portion of SEQ ID NO:4 that amplifies a DNA molecule comprising the two expression cassettes of pMON51915 DNA fragment that was inserted into the MON 88913 genome, the insert comprising about 8,512 bps of the insert, Figure 2). A member of a primer pair derived from the plant genomic sequence may be located a distance from the inserted DNA sequence, this distance can range from one nucleotide base pair up to about twenty thousand nucleotide base pairs. The use of the term "amplicon" specifically excludes primer dimers that may be formed in the DNA thermal amplification reaction.

- 13 -

[0042] Polynucleic acid amplification can be accomplished by any of the various polynucleic acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR). Amplification methods are known in the art and are described, *inter alia*, in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202 and in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. PCR amplification methods have been developed to amplify up to 22 kb (kilobase) of genomic DNA and up to 42 kb of bacteriophage DNA (Cheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). These methods as well as other methods known in the art of DNA amplification may be used in the practice of the present invention. The sequence of the heterologous DNA insert or flanking genomic DNA sequence from MON 88913 can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such DNA molecules from the MON 88913 seed or plants grown from the seed deposited with the ATCC having accession no. PTA-4854, using primers derived from the sequences provided herein, followed by standard DNA sequencing of the PCR amplicon or cloned DNA fragments thereof. DNA detection kits that are based on DNA amplification methods contain DNA primers that specifically amplify a diagnostic amplicon. The kit may provide an agarose gel based detection method, endpoint Taqman®, or any number of methods of detecting the diagnostic amplicon that are known in the art. A kit that contains DNA primers that are homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 is an object of the invention.

[0043] The amplicon produced by these methods may be detected by a plurality of techniques. One such method is Genetic Bit Analysis (Nikiforov, *et al.* Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) where a DNA oligonucleotide is designed that overlaps both the adjacent flanking genomic DNA sequence and the inserted DNA sequence. The oligonucleotide is immobilized in wells of a microtiter plate. Following PCR of the region of interest (using one primer in the inserted sequence and one in the adjacent flanking genomic sequence), a single-stranded PCR product can be hybridized to the immobilized oligonucleotide and serve as a template for a single base extension reaction using a DNA polymerase and labelled dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) specific for the expected next base. Readout may be fluorescent or ELISA-based. A signal indicates presence of the transgene/genomic sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

- 14 -

[0044] Another method is the Pyrosequencing technique as described by Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). In this method an oligonucleotide is designed that overlaps the adjacent genomic DNA and insert DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted sequence and one in the flanking genomic sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase, ATP, sulfurylase, luciferase, apyrase, adenosine 5' phosphosulfate and luciferin. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) are added individually and the incorporation results in a light signal that is measured. A light signal indicates the presence of the transgene/genomic sequence due to successful amplification, hybridization, and single or multi-base extension.

[0045] Fluorescence Polarization as described by Chen, *et al.*, (Genome Res. 9:492-498, 1999) is a method that can be used to detect the amplicon of the present invention. Using this method an oligonucleotide is designed which overlaps the genomic flanking and inserted DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted DNA and one in the flanking genomic DNA sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase and a fluorescent-labeled ddNTP. Single base extension results in incorporation of the ddNTP. Incorporation can be measured as a change in polarization using a fluorometer. A change in polarization indicates the presence of the transgene/genomic sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

[0046] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) is described as a method of detecting and quantifying the presence of a DNA sequence and is fully understood in the instructions provided by the manufacturer. Briefly, a FRET oligonucleotide probe is designed which overlaps the genomic flanking and insert DNA junction. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Hybridization of the FRET probe results in cleavage and release of the fluorescent moiety away from the quenching moiety on the FRET probe. A fluorescent signal indicates the presence of the transgene/genomic sequence due to successful amplification and hybridization.

[0047] Molecular Beacons have been described for use in sequence detection as described in Tyangi, *et al.* (Nature Biotech. 14:303-308, 1996) Briefly, a FRET oligonucleotide

- 15 -

probe is designed that overlaps the flanking genomic and insert DNA junction. The unique structure of the FRET probe results in it containing secondary structure that keeps the fluorescent and quenching moieties in close proximity. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Following successful PCR amplification, hybridization of the FRET probe to the target sequence results in the removal of the probe secondary structure and spatial separation of the fluorescent and quenching moieties. A fluorescent signal results. A fluorescent signal indicates the presence of the flanking/transgene insert sequence due to successful amplification and hybridization.

[0048] DNA detection kits can be developed using the compositions disclosed herein and the methods well known in the art of DNA detection. The kits are useful for identification of cotton event MON 88913 DNA in a sample and can be applied to methods for breeding cotton plants containing MON 88913 DNA. The kits contain DNA sequences that are useful as primers or probes and that are homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or to DNA sequences homologous or complementary to DNA contained in any of the transgene genetic elements of pMON51915 that have been inserted into MON 88913 DNA (Figure 2). These DNA sequences can be used in DNA amplification methods (PCR) or as probes in polynucleic acid hybridization methods, *i.e.*, Southern analysis, northern analysis. The transgene genetic elements contained in MON 88913 DNA (Figure 2) include a first expression cassette comprising the Figwort mosaic promoter constructed as a chimeric promoter element with the *Arabidopsis* elongation factor 1-alpha (At.Ef1 α) promoter (FMV35S/Ef1 α , U.S. Patent 6,462,258, SEQ ID NO:28, herein incorporated by reference in its entirety), operably linked to the *Arabidopsis* elongation factor 1-alpha translational leader and intron (Genbank accession number X16430 as described in Axelos *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 219:106-112, 1989), operably linked to the *Arabidopsis* EPSPS chloroplast transit peptide (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:47-442, 1987), operably linked to a glyphosate tolerant 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium sp.* strain CP4 (aroA:CP4, U.S. Patent 5,633,435), operably linked to the 3' termination region from pea ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase E9 (T-Ps.RbcS2:E9, Coruzzi, *et al.*, *EMBO J.* 3:1671-1679, 1984), and a second expression cassette comprising the CaMV35S-Act8 promoter including the first intron

- 16 -

of the Act8 gene (SEQ ID NO:29, U.S. Patent 6,462,258) operably connected to an *Arabidopsis* EPSPS chloroplast transit peptide (TS-AtEPSPS:CTP2), operably connected to a glyphosate tolerant 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (aroA:CP4, U.S. Patent 5,633,435, herein incorporated by reference in its entirety), operably linked to the 3' termination region from pea ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase E9.

[0049] The following examples are included to demonstrate examples of certain preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent approaches the inventors have found function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute examples of preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

[0050] The transgenic cotton event MON 88913 was generated by an *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton cells with a DNA fragment derived from pMON51915 (Figure 1). The plant transformation construct, pMON51915 was mated into *Agrobacterium* using a triparental mating procedure (Ditta *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7347-7351, 1980). Cotton cell transformation with transgenes can be performed using methods described, *e.g.*, in U.S. Patent 5,004,863, U.S. Patent 5,159,135, and U.S. Patent 5,518,908, herein incorporated by reference in their entirety. Cotton transformation is performed essentially as described in WO/0036911 or as described in U.S. Patent 5,846,797, herein incorporated by reference in its entirety. A modification of these methods can include, but is not limited to the following example. Coker 130 seed is surface sterilized and germinated in the dark. Hypocotyl explants are cut from the germinated seedlings to lengths of about 1-1.5 centimeter. *Agrobacterium tumefaciens* strain ABI transformed to contain pMON51915 is grown in Luria broth without antibiotics for 16 hours at 28 °C, then diluted to approximately 2×10^8 bacteria/milliliter (ml). The hypocotyl explant is submersed in the *Agrobacterium* inoculum for 2-5 minutes, then co-cultivated for about 45 hours on MS+1.9mg/l KNO₃+3%glucose (TRM), 30 explants per plate,

- 17 -

24C, in the dark. The explants are transferred to TRM containing 150 mg/l cefotaxime and 300 EM glyphosate for four culture periods, each period for approximately six weeks. Embryogenic calli is segregated from the primary explant at the end of 3rd or 4th culture periods and placed onto same medium. The embryogenic calli are subcultured once by briefly suspending in liquid TRM +3% glucose, followed by pouring suspension onto 'TRM' + 150mg/l cefotaxime + 300,uM glyphosate plates. The somatic embryos are harvested 3-8 weeks after the liquid subculture, then grown on Stewart and Hsu media with 0. 5% glucose. Plantlets derived from the somatic embryos are matured to about 4-7cm (3-6 leaves) in Magenta boxes with Stewart & Hsu modified with 40mM NO₃/10mM NH₄ + 2% sucrose. These plants are then transplanted to potting soil, 4" pots, 100% humidity, 16hours of light per day, for 4- 6 days, followed by 50% humidity 5-10 days.

[0051] The DNA fragment of pMON51915 contains two transgene expression cassettes inserted into the genome of MON 88913 (Figure 2) that collectively confer glyphosate tolerance to MON 88913 and progeny thereof.

[0052] The MON 88913 plant and seed has regenerable parts. The regenerable parts of the seed include, but are not limited to the embryo, the cotyledon, and the shoot or root meristem. The regenerable parts of the plant include, but are not limited to the leaves, the petiole, the hypocotyl, stem sections, and apical and root meristems. The invention also includes plant parts of cotton event MON 88913 that include, but are not limited to pollen, ovule, flowers, bolls, lint, shoots, roots, and leaves. The invention also includes extractable components of MON 88913 seed that include, but are not limited to protein, meal, flour, hulls, oil, and linter.

EXAMPLE 2

[0053] The glyphosate tolerant cotton event MON 88913 was selected from many transgenic cotton events for tolerance to glyphosate vegetative and reproductive injury. The successful production of a commercial quality transgenic event currently requires producing a large number of transgenic events. In the present invention, MON 88913 was one event among approximately 1000 R0 events that had been transformed with many different DNA constructs that included pMON51915. The MON 88913 event was selected from the many events by a series of molecular analysis and glyphosate tolerance screens.

- 18 -

[0054] The events were screened in a greenhouse glyphosate tolerance test, the plants being scored for vegetative and reproductive tolerance. Fifteen to twenty-five R₁ seeds from each event were planted in 15 cell trays with Metro-Mix 350 growing medium, which contains a combination of peat, vermiculite, nutrients, wetting agents, and processed bark and ash. Additional fertilizers included in the medium were Osmocote 14-14-14, Osmocote Plus 15-9-12, and MicroMax micronutrients. All plants were grown in a greenhouse. The average daytime temperature during the growing season was 32 degrees Celsius (°C), while the average night temperature was 24°C. The photoperiod was set at 16 hours of light and eight hours of dark, with maximum light intensity. The average relative humidity during the growth cycle was 45 percent. The plants were then sprayed at the 4 and 8-leaf stages sequentially with 48 oz/A (oz=ounces, A=acre) of Roundup Ultra® (glyphosate containing herbicide). Seven days after the 4-leaf glyphosate application, the plants were scored for vegetative damage and segregation of the glyphosate tolerant phenotype was collected. These data were used to confirm that the event transgene insert was performing as a single dominant gene, adhering to Mendelian genetic models. Events with good vegetative tolerance were subsequently transplanted in 10-inch pots with the same Metro-Mix 350 growing medium described above and grown to maturity. Plants were treated with Pix Plus (BASF, Research Triangle Park, NC) as needed to regulate the plant height. At three months post-planting, the plants were mapped for boll retention on the first fruiting positions of the first five fruiting branches. The maximum value for retention for this plant map is 5 (five bolls retained). This provided a quick, indirect measure of plant fertility. With this greenhouse screen, the average retention for the current commercial event (RR cotton 1445) is less than 1.0. Events with an average boll retention value greater than or equal to three were harvested and advanced for further event selection. Events that have boll retention values greater than or equal to two have value as new glyphosate tolerant plant selections.

[0055] Events that met the Roundup® Ultra vegetative and reproductive tolerance criteria were analyzed for copy number via Southern blot analysis. Single copy events that showed good tolerance in initial greenhouse experiments were further characterized in 1) additional greenhouse tolerance tests at higher glyphosate rates, 2) replicated field trials, and with 3) additional molecular screens. The greenhouse tolerance tests were conducted using homozygous plants. All of the experiments contained the current commercial Roundup Ready®

- 19 -

cotton event 1445 event (commercial standard) for comparison. Seed were planted in 15 cell trays and treated with 64oz/A Roundup Ultra® at the 4-leaf stage and 96oz/A at the 8-leaf stage. The plants were then transplanted to 10-inch pots and four plants were mapped at mid-season on the first fruiting positions of the first five fruiting branches. End of the season data were also collected on all events and included seed cotton weight, number of bolls, boll size, and boll retention.

[0056] Field testing was used to select the event that showed best growth rates, fruit retention, and yield. The field trials were arranged in a randomized split plot design with three replications and three treatments. The events were planted in two row, 30-foot plots. The treatments consisted of unsprayed, 64oz/A (1.5 lb ae/A) Roundup Ultra® at the 4, 6, 10, 14-node stages, and 96oz/A (2.25 lb ae/A) Roundup Ultra® at the 4, 6, 10, 14-node stages. A mid-season plant map was completed on ten plants per plot. Boll retention data was collected for the first and second fruiting positions of the first five fruiting nodes that provides a boll retention value scale of 0-10. A plant with a boll retention value equal to or greater than 3 on the 0-10 scale has value as a new glyphosate tolerant plant selection.

[0057] Field testing (10 locations) comparing the yield of cotton lint (pounds/acre, lb/A) from MON 88913 and RR cotton 1445 showed that MON 88913 provided substantial protection against glyphosate (pounds of acid equivalent/acre, lb ae/A) effects on yield (Table 1). Yield is a measure of boll retention, cotton plants engineered for glyphosate tolerance that retain a substantial number of bolls in the first and second fruiting positions will maintain a yield advantage over cotton plants that are not as glyphosate tolerant. An effective dose of a glyphosate containing herbicide to control weeds in a field of MON 88913 comprises about 4 oz/A and may exceed 128 oz/A depending on the species of weed to be controlled and the stage of weed development. Glyphosate can be mixed with other herbicides to enhance the herbicidal activity against certain weed species.

Table 1. Comparison of lint yield of MON 88913 and 1445 after glyphosate treatment.

Glyphosate treatment	Yield (lb/A) of 10 Locations		
	0 lb ae/A	1.5 lb ae/A	2.25 lb ae/A
1445	2421.84	1044.19	831.47
MON 88913	2551.58	2587.61	2412.3

EXAMPLE 3

[0058] Cotton genomic DNA for all PCR reactions and Southern blot analyses was isolated using a CTAB procedure (Rogers *et al.*, Plant Mol. Biol. 5:69-76, 1985) or Dneasy™ 96 Plant Kit (Cat. # 69181, Qiagen Inc., Valencia, CA) following the manufacturers instructions. Leaf tissue was collected from plants at the 2-4-leaf stage. The smallest true leaves were collected from each plant and immediately frozen on dry ice. DNA was extracted using, *e.g.*, the following method. The tissue was ground using plastic beads with liquid nitrogen. Five ml of extraction buffer was added to 0.75 gram (g) of tissue and incubated at 55°C for 45 minutes. The CTAB extraction buffer consisted of 100mM Tris pH8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB with the addition of 5µl (microliter) of beta-mercaptoethanol, 5µl of RNase and 1% PVPP. The samples were then extracted with an equal volume of chloroform (5ml) and then centrifuged at 3700 RPM for 15 minutes at room temperature. The aqueous phase was transferred to a new tube and the DNA was precipitated with an equal volume of isopropanol. After centrifugation at 3700 RPM for 15 minutes, the pellets were washed with 70% ethanol, air dried, and resuspended in 250µl of water.

[0059] Cotton genomic DNA adjacent to the transgene insertion was obtained for the MON 88913 event utilizing TAIL-PCR (Liu *et al.*, Plant Journal 8: 457-463, 1995). Extension of the genomic DNA was conducted using the GenomeWalker kit (CloneTech Laboratories, Palo Alto, CA) following the manufacture's protocol. Briefly, the DNA (~5µg) isolated utilizing the CTAB protocol previously described, was digested with various restriction endonucleases (EcoRV, ScaI) at 37°C overnight in a total volume of 100µl. The restriction endonucleases were removed with QIAquick PCR Purification columns (cat #28104, Qiagen, Inc.). The ligation of adaptor molecules were those that were described in the manufacture's protocol.

- 21 -

DNA was amplified using FMV-1 primer (SEQ ID NO:5) with the AP1 primer (CloneTech Laboratories) for the primary reaction and nested FMV-2 primer (SEQ ID NO:6) with the AP2 primer (CloneTech Laboratories) for the secondary reaction.

[0060] The 3' transgene/genomic DNA of the MON 88913 was isolated utilizing inverse PCR. Total genomic DNA (~10µg) was digested with three restriction enzymes; *Bcl*I, *Nco*I, and *Hind*III. The QIAquick PCR Purification columns were used to purify the DNA after digesting overnight at 37°C. The DNA was eluted from the columns with 50µl of water and then diluted to 1ml. The diluted eluate (85µl) was combined with 10µl of buffer (10X) and 5µl of T4 Ligase to circularize the fragments. After an overnight incubation at 16°C, the ligase was heat inactivated at 70°C. The samples were amplified by PCR with a series of nested primers. The primer combinations for PCR included: primary pair 8099-E9-1/E9-2 (SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8) for *Bcl*I and *Nco*I samples and primer pair 8099-E9-1/Act8 rev (SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:9) for the *Hind*III sample; primer pair 8099-E9-2/E9-1 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:11) for *Bcl*I and *Nco*I samples; primer pair 8099-E9-2/Act8 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:12) for the *Hind*III sample; primer pair 8099-E9-3/E9-1 (SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:11) for *Bcl*I and *Nco*I samples and 8099-E9-3/Act8 (SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:12) for the *Hind*III sample. The conditions for the PCR included: primary PCR = 7 cycles of 94°C for 2 seconds, 72°C for 10 minutes; 37 cycles of 94°C for 2 seconds, 67°C for 10 minutes; 1 cycle of 67°C for 10 minutes; secondary and tertiary PCR = 5 cycles of 94°C for 2 seconds, 72°C for 10 minutes; 24 cycles of 94°C for 2 seconds, 67°C for 10 minutes; 1 cycle of 67°C for 10 minutes.

[0061] Alternatively, DNA amplification by PCR of the 3' end of the MON 88913 event can be performed with conditions that include: 7 cycles of 94°C for 25 seconds, 72°C for 3 minutes; 37 cycles of 94°C for 25 seconds, 67°C for 3 minutes; 1 cycle of 67°C for 7 minutes. All subsequent amplifications conducted with the following conditions: 7 cycles of 94°C for 2 seconds, 72°C for 4 minutes; 37 cycles of 94°C for 2 seconds, 67°C for 4 minutes; 1 cycle of 67°C for 7 minutes. All amplicons are visualized on 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. The DNA is prepared for sequencing either by purifying the PCR samples directly with the QIAquick PCR Purification kit (cat# 28104, Qiagen Inc.) or by extracting the appropriate fragment from the gel and using the QIAquick Gel Extraction kit (cat #28704, Qiagen Inc.).

- 22 -

[0062] A series of DNA primers were designed to sequence the transgene insert and the adjacent flanking genomic regions of the MON 88913. DNA primers were designed that allowed amplification of the entire transgene and genomic flanking regions by five overlapping fragments. Unique primers were designed to allow amplification of each EPSPS-CTP2/*aroA*-CP4/RbcS2:E9 region separately. For all fragments used in sequencing, the amplifications were performed in triplicate. The DNA primer pair combinations used as sequencing primers for the 5' transgene/genomic region (SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15), 3' transgene/genomic region (SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:17) and insert genetic elements (SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:19 and SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:11). Total genomic DNA was used for all PCR reactions. All amplicons were visualized on 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. The DNA was prepared for sequencing either by purifying the PCR samples directly with the QIAquick PCR Purification kit or by extracting the appropriate fragment from the gel and using the QIAquick Gel Extraction kit. The DNA sequence was produced using DNA sequence analysis equipment (ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) and DNASTAR sequence analysis software (DNASTAR Inc., Madison, WI).

[0063] The DNA fragments from the flanking regions of MON 88913 transgene/genomic insert were subcloned using a TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen). The DNA sequence of the 5' transgene/genomic region is shown in Figure 4 and the DNA sequence of the 3' transgene/genomic region is shown in Figure 5. In the DNA sequence shown in Figures 4 and 5, the transgene insert sequence is in italics.

EXAMPLE 4

[0064] DNA event primer pairs are used to produce an amplicon diagnostic for cotton event MON 88913 genome. Amplicons diagnostic for MON 88913 genome comprise at least one junction sequence, SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. Event primer pairs that will produce a diagnostic amplicon for MON 88913, in which the primer pairs include, but are not limited to SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15 for the 5' amplicon sequence, and SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:17 for the 3' amplicon when used in the protocol outlined in Table 2. In addition to these primer pairs, any primer pair, homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4, that in a DNA amplification reaction produces an amplicon diagnostic for MON 88913 genome

- 23 -

is an aspect of the present invention. Any single isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON 88913 is an aspect of the invention. Any single isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON 88913 is an aspect of the invention. An example of the amplification conditions for this analysis is illustrated in Table 2 and Table 3, however, any modification of these methods that use DNA primers homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or DNA sequences of the genetic elements contained in the transgene insert of MON 88913 that produce an amplicon diagnostic for MON 88913, is within the ordinary skill of the art. A diagnostic amplicon comprises a DNA molecule homologous or complementary to at least one transgene/genomic junction DNA (SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2) or substantial portion thereof.

[0065] An analysis for event MON 88913 plant tissue sample should include a positive tissue control from event MON 88913, a negative control from a cotton plant that is not event MON 88913, and a negative control that contains no cotton genomic DNA. Additional primer sequences can be selected from SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4 by those skilled in the art of DNA amplification methods, and conditions selected for the production of an amplicon by the methods shown in Table 2 and Table 3 may differ, but result in an amplicon diagnostic for event MON 88913. The use of these DNA primer sequences with modifications to the methods of Table 2 and 3 are within the scope of the invention. The amplicon produced by at least one DNA primer sequence derived from SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 that is diagnostic for MON 88913 is an aspect of the invention.

[0066] DNA detection kits that contain at least one DNA primer derived from SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 that when used in a DNA amplification method produces a diagnostic amplicon for MON 88913 is an aspect of the invention. The amplicon produced by at least one primer sequence derived from any of the genetic elements of pMON51915 that is diagnostic for MON 88913 is an aspect of the invention. A cotton plant or seed, wherein its genome will produce an amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 when tested in a DNA amplification method is an aspect of the present invention. The assay for the MON 88913

amplicon can be performed by using a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler as shown in Table 3, or by methods and apparatus known to those skilled in the art.

Table 2. PCR procedure and reaction mixture conditions for the identification of MON 88913 5' transgene insert/genomic junction region.

Step	Reagent	Amount	Comments
1	Nuclease-free water	add to final volume of 20 μ l	-
2	10X reaction buffer (with $MgCl_2$)	2.0 μ l	1X final concentration of buffer, 1.5 mM final concentration of $MgCl_2$
3	10 mM solution of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP	0.4 μ l	200 μ M final concentration of each dNTP
4	event primer (SEQ ID NO:14) (resuspended in 1X TE buffer or nuclease-free water to a concentration of 10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M final concentration
5	event primer (SEQ ID NO:15) (resuspended in 1X TE buffer or nuclease-free water to a concentration of 10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M final concentration
6	RNase, DNase free (500 ng/ μ l)	0.1 μ l	50 ng/reaction

7	<i>REDTaq</i> DNA polymerase (1 unit/ μ l)	1.0 μ l (recommended to switch pipets prior to next step)	1 unit/reaction
8	Extracted DNA (template): • Samples to be analyzed * individual leaves * pooled leaves (maximum of 50 leaves/pool) • Negative control • Negative control • Positive control	• 10-200 ng of genomic DNA • 200 ng of genomic DNA • 50 ng of cotton genomic DNA (not MON 88913) • no template DNA • 50 ng of MON 88913 genomic DNA	-
9	Gently mix and add 1-2 drops of mineral oil on top of each reaction.		

Table 3. Suggested PCR parameters for different thermocyclers.

[0067] Proceed with the DNA amplification in a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler using the following cycling parameters. The MJ Engine or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler should be run in the calculated mode. Run the Perkin-Elmer 9700 thermocycler with the ramp speed set at maximum.

Cycle No.	Settings: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutes
38	94°C 1 minute 60°C 1 minute 72°C 1 minute and 30 seconds
1	72°C 10 minutes

Cycle No.	Settings: MJ Engine or Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutes
38	94°C 10 seconds 60°C 30 seconds 72°C 1 minute
1	72°C 10 minutes

Cycle No.	Settings: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutes
38	94°C 15 seconds 60°C 15 seconds 72°C 1 minute and 30 seconds
1	72°C 10 minutes

EXAMPLE 5

[0068] MON 88913 genomic DNA and control cotton genomic DNA (~15µg of each) is digested with various restriction enzymes (140U) in a total volume of 150µl including 15µl of the corresponding manufacturer's buffer (NEB, Beverly, MA). Restriction endonucleases, *e.g.*, BglII, BamHI, NcoI, HindIII, and BclII, are used in the Southern analysis of MON 88913. Endonuclease digests are performed at the appropriate temperature for at least 6 hours. After incubating, the DNA is precipitated with 3M sodium acetate and 2.5 volumes of ethanol. Subsequently, the DNA is washed with 70% ethanol, dried, and resuspended in 40µl of TBE. Loading buffer (0.2x) is added to the samples and then electrophoresis conducted on agarose

- 27 -

gels (0.8%) for 16-18 hours at 30 volts. The gels are stained with ethidium-bromide, then treated with a depurination solution (0.125N HCL) for 10 minutes, with a denaturing solution (0.5M sodium hydroxide, 1.5M sodium chloride) for 30 minutes, and finally with a neutralizing solution (0.5M Trizma base, 1.5M sodium chloride) for 30 minutes. The DNA is transferred to Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) using a Turboblotter (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) for 4-6 hours and then fixed to the membrane using a UV light.

[0069] Membranes are prehybridized with 20mls of DIG Easy Hyb solution (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN; cat. #1603558) for 2-4 hours at 45°C. Radioactive DNA probes (³²P dCTP) homologous or complementary to SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:2, or SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:4, or a portion thereof are made using a Radprime DNA Labeling kit (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat. #18428-011). Unincorporated nucleotides are removed using sephadex G-50 columns (Invitrogen). The prehybridization solution is replaced with 10mls of pre-warmed DIG Easy Hyb solution containing the denatured probe to a final concentration of 1 million counts per ml. The blots are hybridized at 45°C for 16-18 hours.

[0070] Blots are washed with a low stringency solution (5X SSC, 0.1X SDS) at 45°C and then repeatedly washed with a higher stringency solution (0.1X SSC, 0.1% SDS) at 65°C. The blots are exposed to a phosphor screen (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for >2 hours and the exposure read using a Data Storm 860 machine (Amersham Biosciences).

EXAMPLE 6

[0071] The methods used to identify heterozygous from homozygous cotton progeny containing event MON 88913 are described in a zygosity assay for which examples of conditions are described in Table 4 and Table 5. The DNA primers used in the zygosity assay are primer SQ1099 (SEQ ID NO:21), SQ1100 (SEQ ID NO:22), SQ1353 (SEQ ID NO:23), 6FAM™ labeled primer (SEQ ID NO:24,), and VIC™ labeled primer (SEQ ID NO:25), 6FAM and VIC are florescent dye products of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA primer.

[0072] SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23 when used in these reaction methods produce a DNA amplicon for non-transgenic cotton, two DNA amplicons for heterozygous cotton containing event MON 88913, and a DNA amplicon for homozygous MON

88913 cotton that is distinct from any other non-MON 88913 cotton. The controls for this analysis should include a positive control from homozygous and heterozygous cotton containing event MON 88913 DNA, a negative control from non-transgenic cotton, and a negative control that contains no template DNA. This assay is optimized for use with a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the zygosity of the progeny of crosses made with MON 88913 cotton plants is within the skill of the art.

Table 4. Zygosity assay reaction solutions

Step	Reagent	Amount	Comments
1	Nuclease-free water	add to 10 μ l final volume	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5 μ l	1 X final concentration
3	Primers SQ1099, SQ1100, SQ1353 (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 20 μ M)	0.5 μ l	0.25 μ M final concentration
4	Primer 6FAM™ (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 10 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ M final concentration
5	Primer VIC™ (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 10 μ M)	0.2 μ l	0.15 μ M final concentration
6	REDTaq DNA polymerase (1 unit/ μ l)	1.0 μ l (recommended to switch pipets prior to next step)	1 unit/reaction

7	Extracted DNA (template): • Samples to be analyzed (individual leaves) • Negative control • Negative control • Positive control • Positive control	3.0 µl • 4-80 ng of genomic DNA • 4 ng of non-transgenic cotton genomic DNA • no DNA template (solution in which DNA was resuspended) • 4 ng of genomic DNA from known event MON 88913 heterozygous cotton • 4 ng of genomic DNA from known event MON 88913 homozygous cotton	Diluted in water
8	Gently mix, add 1-2 drops of mineral oil on top of each reaction.		

Table 5. Zygosity assay thermocycler conditions

[0073] Proceed with the DNA amplification in a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler using the following cycling parameters. When running the PCR in the Eppendorf Mastercycler Gradient or MJ Engine, the thermocycler should be run in the calculated mode. When running the PCR in the Perkin-Elmer 9700, run the thermocycler with the ramp speed set at maximum.

- 30 -

Cycle No.	Settings: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutes
38	94°C 1 minute 60°C 1 minute 72°C 1 minute and 30 seconds
1	72°C 10 minutes

Cycle No.	Settings: MJ Engine or Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutes
38	94°C 30 seconds 60°C 30 seconds 72°C 1 minute and 30 seconds
1	72°C 10 minutes

Cycle No.	Settings: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutes
38	94°C 15 seconds 60°C 15 seconds 72°C 1 minute and 30 seconds
1	72°C 10 minutes

EXAMPLE 7

[0074] Analysis of cotton genomic DNA samples was conducted using an endpoint Taqman® method. The production of amplicons diagnostic for MON 88913 genomic DNA were produced by using a primer set A that included event primers: SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, and 6-FAM probe SEQ ID NO:24; and a primer set B that included event primers: SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, and 6-FAM probe SEQ ID NO:28. The method uses a 96-well or 384-well format and an Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or MJ Research DNA Engine PT-225. DNA extracted from cotton tissue samples as previously described should be within the range of 5-10 ng per PCR reaction. Each reaction contains a final volume of 10µl consisting of 0.5µl of equal concentration of the event primers (20µM), 5.0µl of 2X universal

- 31 -

master mix, 0.2 μ l of the 6-FAM probe (10 μ M), 3 μ l DNA sample (5-10 ng) and water to 10 μ l. The thermal cycler parameters are 1 cycle 50°C for 2 minutes, 1 cycle 95°C for 10 minutes, 10 cycles at 95°C for 15 seconds, 64°C for 1 minute then -1°C/cycle, 30 cycles 95°C for 15 seconds, 54°C for 1 minute, then hold at 10°C. The amplicon production was determined by a microplate reader, *e.g.*, a TECAN Safire (Durham, NC) using the conditions described by the manufacturer. A data analysis program (TaqPro™) was used to score the production of the labeled amplicon. Other equipment and analysis methods known in the art of DNA detection can be used to detect the amplicons of the present invention.

[0075] A deposit of Monsanto Technology LLC, cotton MON 88913 seed disclosed above and recited in the claims, has been made under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. The ATCC accession number is PTA-4854. The deposit will be maintained in the depository for a period of 30 years, or 5 years after the last request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced as necessary during that period.

[0076] Having illustrated and described the principles of the present invention, it should be apparent to persons skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departing from such principles. We claim all modifications that are within the spirit and scope of the appended claims.

[0077] All publications and published patent documents cited in this specification are incorporated herein by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

- 32 -

CLAIMS:

1. Seed of cotton event designated MON 88913 and having representative seed deposited with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No. PTA-4854.
2. The cotton plant or parts thereof produced by growing the seed of claim 1.
3. The cotton plant or parts thereof of claim 2, comprising pollen, ovule, flowers, bolls, lint, shoots, roots, or leaves.
4. Glyphosate tolerant progeny of the cotton plant of claim 2.
5. A progeny cotton plant of claim 4, wherein the genome of said cotton plant comprises one or more DNA molecules selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4.
6. A progeny cotton plant or seed or parts thereof of claim 4, the genome of which produces an amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 in a DNA amplification method.
7. An isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO:1 diagnostic for cotton event MON 88913.
8. An isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913.
9. A DNA detection kit comprising at least one molecule of 11 or more contiguous nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4, that when used in a DNA amplification methods produces an amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913
10. A method of producing a cotton plant that tolerates application of glyphosate herbicide comprising:
 - (a) sexually crossing a first glyphosate tolerant cotton event MON 88913 parent plant and a second parent cotton plant that lacks the tolerance to glyphosate herbicide, thereby producing a plurality of first progeny plants; and
 - (b) selecting a first progeny plant that is tolerant to glyphosate; and

- 33 -

- (c) selfing said first progeny plant, thereby producing a plurality of second progeny plants; and
- (d) selecting from said second progeny plants, a glyphosate tolerant plant.

11. The method of claim 10 further comprising the step of backcrossing the first progeny plant that is tolerant to glyphosate or the second progeny plant that is glyphosate tolerant to the second parent plant or a third parent plant, thereby producing a plant that tolerates the application of glyphosate.

12. A method of detecting the presence of DNA corresponding to cotton event MON 88913 in a sample, the method comprising:

- (a) contacting the sample comprising DNA with a DNA primer set, which when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from the cotton event MON 88913, produces a diagnostic amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; and
- (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the diagnostic amplicon; and
- (c) detecting the diagnostic amplicon.

13. In the method of claim 12, where in said primer set comprises SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:24.

14. In the method of claim 12, wherein said primer set comprises SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:28.

15. A method of detecting the presence of a DNA corresponding to cotton event MON 88913 in a sample, the method comprising:

- (a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from the cotton event MON 88913 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control cotton plant genomic DNA, wherein said probe is homologous or complementary to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; and
- (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and
- (c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

- 34 -

16. A cotton plant comprising a glyphosate tolerant trait that is genetically linked to a complement of a marker polynucleic acid, wherein said marker polynucleic acid molecule is homologous or complementary to a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

17. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

- (a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON 88913, produces a first amplicon that is diagnostic for cotton event MON 88913; and
- (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the first amplicon; and
- (c) detecting the first amplicon; and
- (d) contacting the sample comprising cotton DNA with said primer set, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton plants produces a second amplicon comprising the native cotton genomic DNA homologous to the cotton genomic region of a transgene insertion identified as cotton event MON 88913;
- (e) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the second amplicon; and
- (f) detecting the second amplicon; and
- (g) comparing the first and second amplicons in a sample, wherein the presence of both amplicons indicates the sample is heterozygous for the transgene insertion.

18. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

- (a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, and SEQ ID NO:25; and
- (b) performing a nucleic acid amplification reaction; and
- (c) detecting the products of the reaction.

- 35 -

19. A method for controlling weeds in a crop of cotton event MON 88913 comprising the step of applying an effective dose of a glyphosate containing herbicide to said crop of cotton event MON 88913.

AMENDED CLAIMS

[received by the International Bureau on 26 January 2005 (26.01.05)]

original claim 1,7,8,10,12,15 and 19 have been amended

New claim 10 has been added

[4 pages]

1. (Amended) Seed of cotton event designated MON 88913 comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and having representative seed deposited with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No. PTA-4854.

2. The cotton plant or parts thereof produced by growing the seed of claim 1.

3. The cotton plant or parts thereof of claim 2, comprising pollen, ovule, flowers, bolls, lint, shoots, roots, or leaves.

4. Glyphosate tolerant progeny of the cotton plant of claim 2.

5. A progeny cotton plant of claim 4, wherein the genome of said cotton plant comprises one or more DNA molecules selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4.

6. A progeny cotton plant or seed or parts thereof of claim 4, the genome of which produces an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO:2 in a DNA amplification method.

7. (Amended) ~~[An isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3, or its complement that is]~~ A DNA primer set comprising two DNA molecules, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:3 or its complement, and the second DNA molecule of similar length comprises any portion of a 5' flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:3 or its complement, where these DNA molecules when used together are useful in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 diagnostic for cotton event MON 88913.

8. (Amended) ~~[An isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4, or its complement that is useful]~~ A DNA primer set comprising two DNA molecules, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:4, or its complement, and the second [a] DNA molecule of similar length [of] comprises any portion of a 3' flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:4, or its complement, where these DNA molecules when used together are useful as a DNA primer set in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913.

9. A DNA detection kit comprising at least one molecule of 11 or more contiguous nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4, that when used in a DNA amplification methods produces an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913.

AMENDED SHEET (ARTICLE 19)

10. (Amended) A method of producing a cotton plant that tolerates application of glyphosate herbicide comprising:

- (a) sexually crossing a first glyphosate tolerant cotton event MON 88913 parent plant comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and a second parent cotton plant that lacks the tolerance to glyphosate herbicide, thereby producing a plurality of first progeny plants; and
- (b) selecting a first progeny plant that is tolerant to glyphosate; and
- (c) selfing said first progeny plant, thereby producing a plurality of second progeny plants; and
- (d) selecting from said second progeny plants, a glyphosate tolerant plant.

11. The method of claim 10 further comprising the step of backcrossing the first progeny plant that is tolerant to glyphosate or the second progeny plant that is glyphosate tolerant to the second parent plant or a third parent plant, thereby producing a plant that tolerates the application of glyphosate.

12. (Amended) A method of detecting the presence of DNA corresponding to cotton event MON 88913 comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 in a sample, the method comprising:

- (a) contacting the sample comprising DNA with a DNA primer set comprising
 - (i) at least 11 contiguous nucleotides of a 5' flanking cotton genomic DNA region flanking the insertion site in cotton event MON 88913 or its complement, or a 3' flanking cotton genomic DNA region flanking the insertion site in cotton event MON 88913 or its complement, and
 - (ii) at least 11 contiguous nucleotides of the transgene region of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4;

which when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from the cotton event MON 88913, produces a diagnostic amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; and

- (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing ~~(the diagnostic)~~ a sample amplicon; and
- (c) comparing the sample amplicon to the [detecting the] diagnostic amplicon to determine whether the sample amplicon comprises SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

13. In the method of claim 12, where in said primer set comprises SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:24.

14. In the method of claim 12, wherein said primer set comprises SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:28.

15. (Amended) A method of detecting the presence of a DNA corresponding to cotton event MON 88913 in a sample, the method comprising:

(a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from the cotton event MON 88913, comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control cotton plant genomic DNA, wherein said probe is homologous or complementary to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; and

(b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and

(c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

16. A cotton plant comprising a glyphosate tolerant trait that is genetically linked to a complement of a marker polynucleic acid, wherein said marker polynucleic acid molecule is homologous or complementary to a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

17. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

(a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON 88913, produces a first amplicon that is diagnostic for cotton event MON 88913; and

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the first amplicon; and

(c) detecting the first amplicon; and

(d) contacting the sample comprising cotton DNA with said primer set, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton plants produces a second amplicon comprising the native cotton genomic DNA homologous to the cotton genomic region of a transgene insertion identified as cotton event MON 88913;

(e) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the second amplicon; and

(f) detecting the second amplicon; and

(g) comparing the first and second amplicons in a sample, wherein the presence of both amplicons indicates the sample is heterozygous for the transgene insertion.

18. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

(a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, and SEQ ID NO:25; and

(b) performing a nucleic acid amplification reaction; and

(c) detecting the products of the reaction.

19. (Amended) A method for controlling weeds in a crop of cotton event MON 88913 comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, comprising the step of applying an effective dose of a glyphosate containing herbicide to said crop of cotton event MON 88913.

AMENDED SHEET (ARTICLE 19)

25

WO 2004/072235

39

PCT/US2004/002907

20. (New) The method of claim 12, wherein the DNA primer set comprises at least one molecule of 11 or more contiguous nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4.

AMENDED SHEET (ARTICLE 19)

1/5

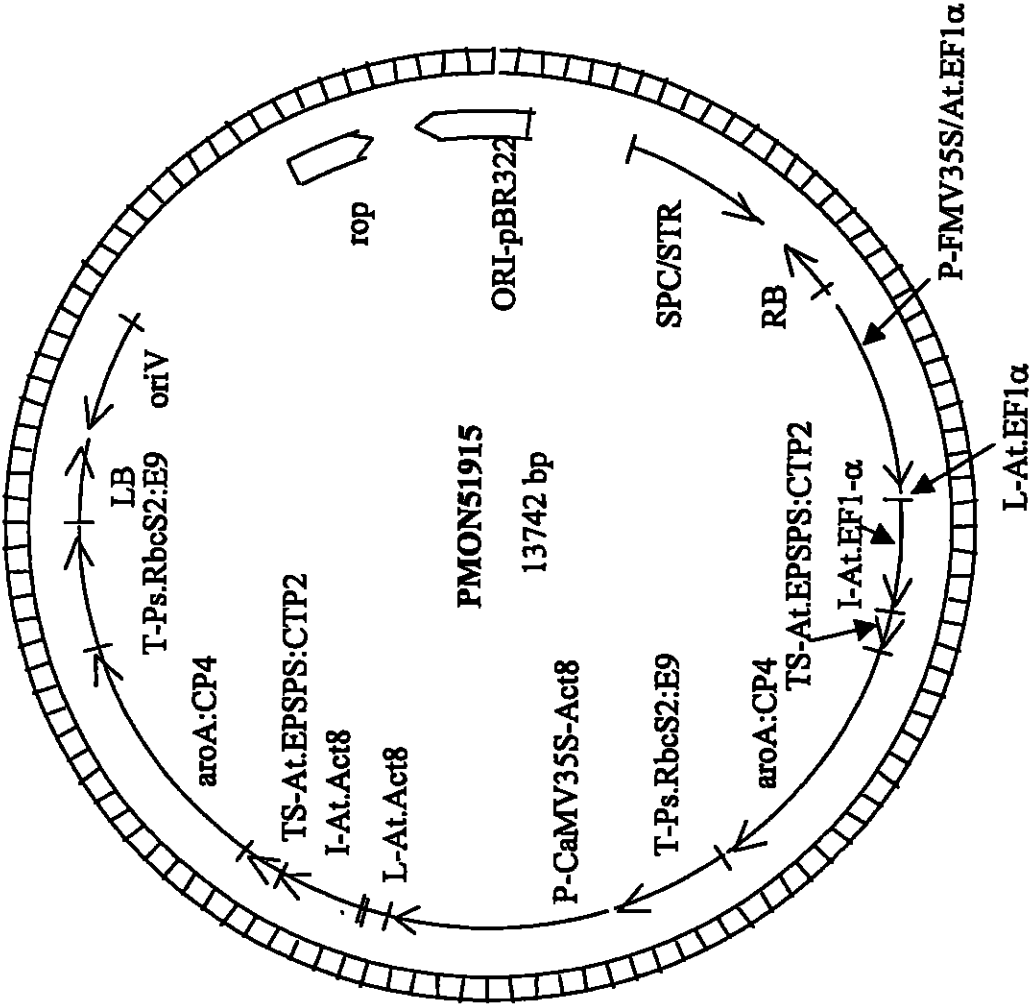


FIGURE 1

MON88913

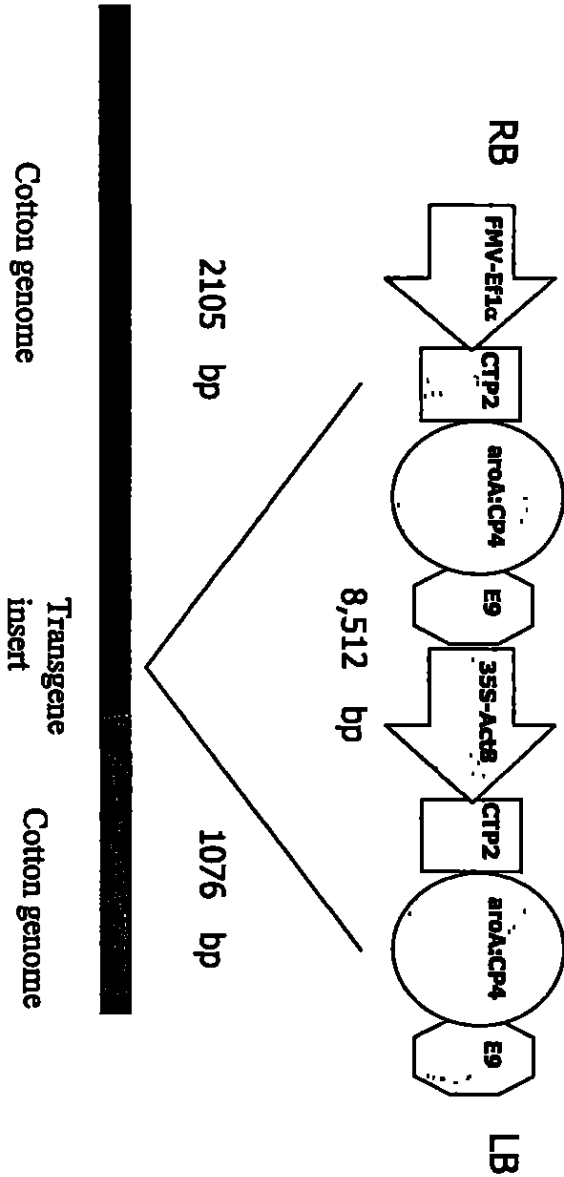


FIGURE 2

3/5

SEQ ID NO:1 5' DNA junction sequence:
ATTCAATGTA/GTCAAACACT

SEQ ID NO:2 3' DNA junction sequence:
TTGAATATAT/ATTACAAAGC

FIGURE 3

4/5

1 GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA TTCGCCCTTT
61 TTTACTACGA TGTTAAGTCC TATTTTACAC AGTTTCTTTA AGACAGATTT GACCGCTCCT
121 ACGATACTTG GAGAAACGTT GGTGGAATGT CTCTTAGAAT ACAACAACAC GATGATCAAA
181 GCAGTAGCAC CTCTGTAGTG ATTAACGAAC AAGCGTTGTC TTTTCTATC ACCAAAACAT
241 TGGAAAACAT GGAGAGGAAA AGAGTAGAAT TTTGGAAAAG AAATAATCTT GGTATGAGAG
301 AGTGAGATTG AGCAAAAAAT TTTGAAGAGG TCTTAGCCTT TTATATGCGT TCAAAGTGGA
361 GGAATTTTGG AAATATCCAT GTATAATGAG ACAAATCTG CATTTAAAAAT GGCATTTCCG
421 GTCGCCTGCG TCGTGCAGT GCGCCCCAAC CCTGACGGGT TTGGACTTAC ACCCTCATAC
481 ACGCGAGGCA CGATTCCAAG TTAGTCATT CAATCACTCT TAAAGTGAGC TTCAAGCTTA
541 GACATTACAA ATTAAATTAA ATAATATAAG ATAATTGCGC TAAATAACA AACATTTTTT
601 TTGTGATCCT GAACGTAATC AACGAGGGTA TGATGGTTAT GATTCACGGA AAGAGCGAGA
661 GAAGAGAACC GTCGCTCGAA GAGGATGATG ATTCATCCTA TTCATGCACG ACTGTCCAAC
721 TCCCCACCCA ATCAAATCC AAATTATGAC ATGAGAAGAA CATCATCCCA CGTGGTCTGT
781 GCTTCACGCC ACCATGTCCC ACGTGGGCTC CATTTTGGTG GGGCCCTTCC ACCCGCCCA
841 AGCTGATCCC GGSTTGGCCA TCCCTACTTT TAATTATCAG AGCCACCTCC CCAATCTGCA
901 AAACGACGGA AATGGAAAAC TATAATTTTC TTTTTTTTCA ACGTACTTAT AAAATATTTT
961 TCAAAAAAGT ATGAATAAAA TTGTGATATT GCTTGGCCTA AGAGGCCAAT CTTTGTCAAA
1021 TCTCGAAGTC GGGAGGCACA ATAAAACTT GGAAAGTTT TTCAAGTGTC TGCTTTATAA
1081 AATTATTGAA ATGCATGTAT TCGTACTTGC CTTATTTATC GACAATTTAA ACATTATTAT
1141 TTCATGAAA TGTCCTTCCA CCGATTTCAA TGACAAAACC AATAATTACT ACTTTTTATT
1201 TTCAATTATG TCACGGTTCA CATGTTTATT AGGGTTTAGG TTGAGGTAA AACTTTCGAC
1261 TCTCTATTCTG TAACGCTTAA AGATGTAGGG TTTAGGTTGA GGTTAAACA ATCATGTAAT
1321 GTAAGGATAC CTGAAAAGCT GTCATTAGTG TAAGTGTTA TTACTAGGGT TGTTTAAAT
1381 CATGTTGATG TCAAGCTTGG ATAACCCATT TTACTAAAAA AATAAATGAA GTCCCAAAGG
1441 GCATTGGGCA TCCTATCAAA GATGGGAAAT TTTTCAAAA TTTTAACCTA AAAAGAGAGT
1501 GGAAAGTCTT AGTCCAAATA ATCAGCCACA TCAGAATTG ATTGCTTCTT TTCAAGCAA
1561 TTATACCTAT TGGCTGCAAT ATCTTTAAGT GGAATGGTCG GCCAACTTT TCCATATCAG
1621 CTTGATTCAT CTCTAACTT GATTATTCTT TTTTATTAAT ATTAAATTCC ACAACTTGAA
1681 CTTTAATTTT TTTAATTAAT TAAAAAATT GTCACCTTTT CAAGCTGAAA AAGAAAAAGA
1741 AACCTTAATT ATTATCACTA GTATTAAATT TCAAACCTG ATTTGTCCTA AATTGAAAA
1801 GGGGTCTCCT TCAATTCATA TATGTAGTCA TGAAGATTAT AACTTAGCTG AAAATGGCCT
1861 CCATTATTG GCTTATTCAA TCAAAAGTTT ACAAACCTAG TGCAAATTA ATATGATAAT
1921 GTCTACAAGA ACCAAATACG AATTGAGTAA ATTTTTTGG CTAAATAAA TTACGAATTG
1981 ATGAATTATC ATTTTAAAA GTTCTTTTAA ACCATTCTT TTACTGAATT AAAAAAGGT
2041 TTTATTAATC ATATATATTA CAAATTACCC ATTAAGTAGC CAAATTACAA ATTTTAATTC
2101 AATGTAGTCA AACACTGATA GTTTAAACAT GACTCTCTTA AGGTAGCCAA AGCCCGGGCT
2161 TAATTAAGGC GCGCCGGCCA AGTCGGCCGC GGCCGCGTTA TCAAGCTTCT GCAGGTCTG
2221 CTCGAGTGGA AGCTAATTCT CAGTCCAAAG CCTCAACAAG GTCAGGGTAC AGAGTCTCCA
2281 AACCATTAGC CAAAAGCTAC AGGAGATCAA TGAAGAATCT TCAATCAAAG TAACTACTG
2341 TTCCAGCACA TGCATCATGG TCAGTAAGTT TCAGAAAAAG ACATCCACCG AAGACTTAAA
2401 GTTAGTGGGC ATCTTTGAAA GTAATCTTGT CAACATCGAG CAGCTGGCTT GTGGGGACCA
2461 GACAAAAAAG GAATGGTGCA GAATTGTTAG GCGCACCTAC CAAAAGCATC TTTGCCTTTA
2521 TTGCAAAGAT AAAGCAGATT CCTCTAGTAC AAGTGGGGAA CAAAATAACG TGGAAAAGAG
2581 CTGTCTGAC AGCCCACTCA CTAATGCGTA TGACGAACGC AGTGACGACC ACAAAGAAT
2641 TAGCTTGAGC TCAGGATTTA GCAGATTCC AGATTGGGT CAATCAACAA GGTACGAGCC
2701 ATATCACTTT ATTCAAATTG GTATCGCCAA AACCAAGAAG GAACCTCCAT CCTCAAAGGT
2761 TTGTAAGGAA GAATTCGATA TCAAGCTTGA TATCGGAAGT TTCTCTCTTG AGGGAGGTTG
2821 CTCGTGGAAT GGGACACATA TGGTTGTTAT AATAAACCAT TTCCATTGTC ATGAGATTTT

FIGURE 4

20

5/5

1 TGACCGAAGT TAATATGAGG AGTAAAAACAC TTGTAGTTGT ACCATTATGC TTATTCACTA
61 GGCAACAAAT ATATTTTCAG ACCTAGAAAA GCTGCAAATG TTACTGAATA CAAGTATGTC
121 CTCTTGTTT TTAGACATTT ATGAACTTTC CTTTATGTAA TTTTCCAGAA TCCTTGTCAG
181 ATTCTAATCA TTGCTTTATA ATTATAGTTA TACTCATGGA TTGTAGTTG AGTATGAAAA
241 TATTTTTTAA TGCATTTTAT GACTTGCCAA TTGATTGACA ACATGCATCA ATCGACCTGC
301 AGCCACTCGA GTGGAGGCCCT CATCTAAGCC CCCATTTGGA CGTGAATGTA GACACGTCGA
361 AATAAAGATT TCCGAATTAG AATAATTTGT TTATTGCTTT CGCCTATAAA TACGACGGAT
421 CGTAATTTGT CGTTTTATCA AAATGTACTT TCATTTTATA ATAACGCTGC GGACATCTAC
481 ATTTTGAAT TGAAAAAAA TTGGTAATTA CTCTTCTTT TTCTCCATAT TGACCATCAT
541 ACTCATTGCT GATCCATGTA GATTCCCGG ACATGAAGCC ATTTACAATT GAATATATAT
601 TACAAAGCTA TTTGCTTATA ACATATGCGA AAAATTTTGT ACTAATATCA GGGGTAAATT
661 TAGGAGGGGG CTTGTAGGTC TCGCTTCTCT TAAAATGAAA AATTTTCTAT TTAGTTATTT
721 AAAATTTTAA AAGTAAAAATA TAAAAATTC ATTTAATCCT TTAAAAATTA TAAAGATATA
781 GACTATTAAA ATGATGAAAT TACAATTTTA TTATCATAAA AATTATAATT TAATTTTCGAC
841 CCCTAACAAA ATTTTCTGAT TTGCCCCCTA ACTGTAATAT TTGTATAAAA ACATTTTCTT
901 TTTGCATTTA ATGATTTCTT TAATTCAGTC CAAGAAAGAA ATTTATTAAT TGCATATGCG
961 AAAGTTAGTC CTTGCCTAGT GATATTAAAG GAAAGAAACA TAAAATCAAT AAATTAATTT
1021 TTAAAGCAAA TAGTAAAAAT AAGGAAAAAC TTTCTACGAT AGTCTATAAT TCAAAAAAG
1081 AAATAATAAT CTTTAACCAT TGAATTTTAA AATAACATCA GAATAATCTA TTTATTTAAT
1141 TTAATAAATA ATAATAACAT ATATATTAAT ATTAAATTT TTATTGAGCT TAGTGTCACA
1201 AATCAATAAA AAATTTCTTA CAAAATAAAT TATATTATTT TGAGGGTGTT TTATTATTTT
1261 ATATATTTTA TACAGACATA TAGAAATATA AATACACATA ATAAAATTG AATCCAAATT
1321 TTTAATTTTT AACATTTATA ATTTACTATT CAACCAAAAT TTTATTTATT ATTTATATCA
1381 AATTTTTATA AATATATTTA TCAGATAATG CGATTTTTTT TACCTATATA TAGATGACAT
1441 AATCTACTTT AAATTAAGTC CTAAAAATA TATATCATAC CAAAAAATT CTTAAATGA
1501 ATCTGATAAT ACTTAACCCC TTTTATAAAA CAATCTTAAC CCCTTATATA TTTTAATATT
1561 AATATCATTA TAAATATAAA TCTATTGAGC ATATGTTTTA AACCAAGTAA TGTTGAGTGC
1621 GGTAGTAAAA CTCATTACAC ATTTTAAGTA GAACGTAGTT CGAACCTTGG AGAAG

FIGURE 5

SEQUENCE LISTING

<110> Cerny, Eric
 Duong, Can
 Hart, Jesse
 Huber, Scott
 Krieb, Rachel
 Listello, Jennifer
 Martens, Amy
 Sammons, Bernard

<120> Cotton Event MON 88913 and Compositions and Methods for Detection
 Thereof

<130> 11899.0239.00PC00 (MOBT:239P)

<150> 60/447,184
 <151> 2003-02-12

<160> 28

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric DNA of cotton genomic DNA and transgene insert DNA

<400> 1
 attcaatgta gtcaaacact 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric DNA of cotton genomic DNA and transgene insert DNA

<400> 2
 ttgaatatat attacaaagc 20

<210> 3
 <211> 2880
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric DNA of cotton genomic DNA and transgene insert DNA

<400> 3
 gcttggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttt 60
 tttactacga tgttaagtcc tattttacac agtttcttta agacagattt gaccgctcct 120
 acgatacttg gagaaacggtt ggtcgaatgt ctcttagaat acaacaacac gatgatcaaa 180

```

atgaattatc attttaaaaa gttcttttta accattttctt ttactgaatt aaaaaaagggt 2040
tttattaatc atatatatta caaattaccc attaagtagc caaattacaa attttaattc 2100
aatgtagtca aacactgata gtttaaacat gactctctta aggtagccaa agcccgggct 2160
taattaaggc gcgccggcca agtcggccgc ggccgcgtta tcaagcttct gcaggctctg 2220
ctcgagtgga agctaattct cagtccaaag cctcaacaag gtcagggtac agagtctcca 2280
aaccattagc caaaagctac aggagatcaa tgaagaatct tcaatcaaag taaactactg 2340
ttccagcaca tgcacatggt tcagtaagtt tcagaaaaag acatccaccg aagacttaaa 2400
gttagtgggc atctttgaaa gtaatcttgt caacatcgag cagctggctt gtggggacca 2460
gacaaaaaag gaatggtgca gaattggttag gcgcacctac caaaagcatc ttgaccttta 2520
ttgcaaagat aaagcagatt cctctagtag aagtggggaa caaaataacg tggaaaagag 2580
ctgtcctgac agcccactca ctaatgcgta tgacgaacgc agtgacgacc aaaaagaat 2640
tagcttgagc tcaggattta gcagcattcc agattgggtt caatcaacaa ggtacgagcc 2700
atatcacttt attcaaattg gtatcgccaa aaccaagaag gaactcccat cctcaaagggt 2760
ttgtaaggaa gaattcgata tcaagcttga tatcggaagt ttctctcttg agggagggtg 2820
ctcgtggaat gggacacata tggttgttat aataaaccat ttccattgtc atgagatttt 2880

```

```

<210> 4
<211> 1675
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Chimeric DNA of cotton genomic DNA and transgene insert DNA

```

```

<400> 4
tgaccgaagt taatatgagg agtaaaacac ttgtagttgt accattatgc ttattcacta 60
ggcaacaaat atattttcag acctagaaaa gctgcaaattg ttactgaata caagtatgtc 120
ctcttggtgt ttagacattt atgaactttc ctttatgtaa ttttccagaa tccttgtcag 180
attctaataca ttgctttata attatagtta tactcatgga tttgtagttg agtatgaaaa 240
tattttttta tgcattttat gacttgccaa ttgattgaca acatgcatca atcgacctgc 300
agccactcga gtggaggcct catctaagcc cccatttgga cgtgaatgta gacacgtcga 360
aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat 420
cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgctgc ggacatctac 480
atTTTTgaat tgaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat 540
actcattgct gatccatgta gatttcccg acatgaagcc atttacaatt gaatatatat 600
tacaagcta ttgcttata acatatgcga aaaattttgt actataatca ggggtaaatt 660

```

<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum	
<400>	8	
	g tt g t c g a a a c c g a t g a t a c g	21
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	9	
	t c t g c a a t c a a a a c a t a a a g a t c t g a	27
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum	
<400>	10	
	c c t a t a a a t a c g a c g g a t c g t a a t t t g t c g	30
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum	
<400>	11	
	a c c g a t g a t a c g a a c g a a a g c	21
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	12	
	a a t c g t a a t c g a g a t c c a a c a c a a g	25
<210>	13	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum	
<400>	13	
	c c a t a t t g a c c a t c a t a c t c a t t g c t g a t c c	31
<210>	14	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Agrobacterium tumefaciens	

<213> Gossypium hirsutum

<400> 21
aattacccat taagtagcca aattacaaa 29

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Figwort mosaic virus

<400> 22
gggctttggc taccttaaga gagt 24

<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 23
cgcatatggtt ataagcaaata agctttg 27

<210> 24
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> labeled PCR DNA probe

<400> 24
caatgtagtc aaacact 17

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> labeled PCR DNA probe

<400> 25
agtgtacata tagggaatat 20

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA primer for PCR

<400> 26
ggacatgaag ccatttaca ttga 24

<210> 27

EVENTO DE ALGODÓN MON 88913 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA SU DETECCION

[0001] Esta aplicación reivindica beneficio de la Aplicación Provisional U S No 60/447,184, presentada en febrero 12, 2003, en cuyo contenido integral esta incorporado aquí por referencia

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se relaciona con el campo de la biología molecular de la planta Mas específicamente, la invención se relaciona al evento de algodón MON 88913 tolerante al glifosato y a ensayos y métodos para detectar la presencia del evento de algodón 88913 DNA en una muestra de la planta y composiciones de ella

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] El algodón es un importante cultivo de fibra en muchas áreas del mundo. Los métodos de la biotecnología han venido siendo aplicados al algodón para mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto El método de introducir transgenes en las plantas de algodón ha sido demostrado en la patente U S No 5,004,863 Uno de tales rasgos agronómicos importante en la producción de algodón es la tolerancia a los herbicidas, en particular, tolerancia al herbicida de glifosato Este rasgo ha sido introducido en las plantas de algodón y un producto exitoso ahora usado en la producción de algodón El actualmente comercializado Roundp Ready ® evento de algodón (1445) provee una excelente resistencia al glifosato, el ingrediente activo en Roundp Ready ®, a través de la etapa de cuatro-hoja (Nida et al, J Agric Food Chem 44 1960-1966, 1966, Nida et al, J Agric Food Chem 44 1967-1974, 1996) Sin embargo, aplicación folicular mas allá de la etapa de cuarta-hoja debe ser limitada

debido a insuficiente tolerancia en los tejidos reproductivos masculinos en ciertas condiciones ambientales. Esta carencia de tolerancia de la reproductividad masculina parece ser el resultado de insuficiente expresión de CP4 EPSPS en los tejidos críticos, mas sensibilidad de estos tejidos al glifosato, y acumulación de altas cantidades de glifosato en estos tejidos hundidos fuertes (Pline et al , Wees Sci 50 438 —447, 2002). Hay una necesidad por una planta de algodón mas altamente tolerante al glifosato que el algodón (1445) Roundp Ready ®.

[0004] Sería ventajoso que sea posible la detección de un evento particular con el propósito de determinar si el progenie de un cruce sexual contiene el transgene de interés. Adicionalmente, un método para detectar un evento particular sería útil para cumplir con las normas que requieren una aprobación pre-mercado o etiquetado de los alimentos derivados de la recombinación de plantas, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgene por cualquiera de los bien conocidos métodos de detección de ácido nucleico tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridización de DNA usando sondas de ácido nucleico. Estos métodos de detección generalmente se focalizan en elementos genéticos frecuentemente utilizados, tales como los promotores, los terminadores de transcripción 3', los marcadores de genes etc. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre eventos diferentes, particularmente aquellos producidos usando el mismo constructo de DNA a menos que la secuencia del DNA cromosomal genómico adyacente al DNA inyectado ("DNA genómico flaqueante") sea conocido. Métodos de detección de DNA de eventos específicos para un evento de algodón 1445 tolerante al glifosato han sido descritos (US 20020120964), incorporada aquí en su integridad).

[0005] La presente invención se relaciona con el evento de algodón MON 88913 resistentes al glifosato, a los compuestos contenidos en él, y al método para la detección de la región de inserción transgénico/genómica en el evento de algodón MON 88913 y los progenies de él.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se relaciona con el evento de algodón transgénico denominado MON 88913 que tiene semillas depositadas con el American Type Culture Collection (ATCC) con No de acceso PTA-4854 Otro aspecto de la invención comprende las plantas progeñe, o semillas, o las partes regenerables de las plantas y semillas del evento de algodón MON 88913 La invención también incluye partes de la planta del evento de algodón MON 88913 que incluyen, pero no se limitan a polen, óvulo, flores, capsulas, motas, tallos, raíces y hojas La invención se relaciona con una planta de algodón que tiene un fenotipo tolerante al glifosato y la novel composición genética de MON 88913

[0007] Una aspecto de la invención provee composiciones de DNA y métodos para detectar la presencia de una región de unión transgene/genómica de un evento de la planta de algodón MON 88913 Moléculas aisladas de DNA son proveídas que comprenden al menos una molécula de DNA de unión transgene/genomica seleccionada de un grupo consistente de la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO 2 y complementos de ellas, donde la molécula de unión cubre el sitio de inserción que comprende un DNA heterólogo insertado dentro del genoma del algodón y el DNA genómico de la célula de algodón que flanquea el sitio de inserción en el evento de algodón MON 88913. Una semilla de algodón y el material de planta de ellos que incluye estas moléculas es una aspecto de esta invención.

[0008] Una novedosa molécula de DNA aislada es proveída que es una SEQ ID NO 3 de región 5' transgene/genómica o un complemento de ella, donde esta molécula de DNA es nueva en el evento de algodón MON 88913. Una planta y semilla de algodón que incluye la SEQ ID NO.3 en su genoma es un aspecto de la invención De acuerdo a otro aspecto de la invención, una molécula aislada de DNA es proveída que es una SEQ ID NO 4 de región 3' transgene/genómica , o complemento de ella, donde la molécula de DNA es nueva en el evento de algodón MON 88913 Una planta y una

semilla de algodón que incluye una SEQ ID NO:4 en su genoma es un aspecto de la invención

[0009] De acuerdo a otro aspecto de la invención, dos moléculas de DNA son proveídas para usar en un Método de amplificación de DNA, donde la primera molécula de DNA incluye al menos 11 o mas polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de DNA de SEQ ID NO 3, y una molécula de DNA de similar longitud de cualquier porción de una región 5' de DNA genómico de algodón de flanco de secuencia SEQ ID NO:3, donde estas moléculas cuando son usadas en conjunto son útiles como un conjunto primer de DNA en el método de amplificación de DNA que produce un amplicón. El amplicón producido usando el conjunto primer de DNA en el método de amplificación de DNA es diagnóstico para el evento de algodón MON 88913. Cualquier amplicón producido desde DNA de MON 88913 por primers de DNA que son homólogos o complementarios de cualquier porción de SEQ ID NO 3 es un aspecto de la invención.

[0010] De acuerdo a otro aspecto de la invención, dos moléculas de DNA son proveídas para usar en un método de amplificación de DNA, donde la primera molécula de DNA comprende al menos 11 o mas polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgénica de una molécula de DNA de SEQ ID NO:4 y una molécula de DNA de longitud similar de cualquier porción de la región de DNA genómico de 3' algodón de flanco de SEQ ID NO 4, donde estas moléculas de DNA son útiles como conjunto primer de DNA en un método de amplificación de DNA. El amplicón producido usando el conjunto primer de DNA en el método de amplificación es diagnóstico del evento de algodón MON 88913. El amplicón producido desde DNA de MON 88913 por primer de DNA que son homólogos o complementarios a cualquier porción de SEQ ID NO 4 son un aspecto de la invención.

[0011] De acuerdo a otro aspecto de la invención, métodos para detectar la presencia de DNA que corresponda específicamente al DNA del evento de algodón MON 88913 en una muestra son proveídos. Tales métodos comprenden (a) contactar la muestra

que incluye el DNA con un conjunto primer de DNA que, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico del evento de algodón MON 88913 produce un amplicón que es diagnóstico del evento de algodón MON 88913 (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico y así producir el amplicón, y (c) detectar el amplicón.

[0012] De acuerdo a otro aspecto de la invención, métodos para detectar la presencia de DNA que corresponde específicamente al DNA del evento de algodón MON 88913 en una muestra son proveídos. Tales métodos comprenden. (a) contactar la muestra que incluye DNA con una sonda de DNA que incluye SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, que hibridiza bajo rigurosas condiciones de hibridización con el DNA genómico del evento de algodón MON 88913 y no hibridiza bajo rigurosas condiciones de hibridización con un de DNA de una planta de algodón de control, (b) sometiendo la muestra y la sonda a rigurosas condiciones de hibridización, y (c) detectar la hibridización de la sonda al DNA del evento de algodón MON 88913

[0013] De acuerdo a otro aspecto de la invención, son proveídos métodos para producir una planta de algodón que tolera la aplicación de glifosato son que incluyen los pasos de (a) cruzar sexualmente un primer evento de algodón MON 88913 parental que incluyen los cartuchos de expresión de la presente invención, el cual le confiere tolerancia, en consecuencia produciendo una pluralidad de plantas progenie y (b) seleccionar una planta progenie que tolere la aplicación del glifosato. Tales métodos pueden opcionalmente comprender un paso adicional de cruzar nuevamente la planta progenie con una segunda planta de algodón parental y seleccionar el progenie tolerante al glifosato para producir una variedad de algodón verdaderamente-reproducible que tolera la aplicación del glifosato

[0014] De acuerdo a otro aspecto de la invención, un método es proveído para determinar la zigocidad del progenie del evento de algodón MON 88913 que comprende (a) contactar la muestra que incluye el DNA de algodón con un conjunto primer que incluyen SEQ ID NO:21, SEQ ID NO 22, SEQ ID No 23, SEQ ID NO 24, y

SEQ ID NO 25 que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con el DNA genómico del evento de algodón MON 88913, produce un primer amplicón que es diagnóstico del evento de algodón MON 88913, y (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el primer amplicón, y (c) detectar el primer amplicón, y (d) contactar la muestra que incluye DNA de algodón con el mencionado conjunto primer, que cuando es usado en una reacción de amplificación con DNA genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que incluye el DNA genómico de algodón nativo homólogo a la región genómica de algodón de una inserción transgene identificada como evento de algodón MON 88913, y (e) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el segundo amplicón; y (f) y detectar el segundo amplicón, y (d) comparar el primer y segundo amplicón en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterozigo para la inserción transgene

[0015] Un método para determinar la zigocidad que comprende contactar una muestra de DNA de algodón con primers y sondas que incluyen SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID No 23, SEQ ID NO 24, y SEQ ID NO 25; utilizando una condición Taqman® PCR de punto final, y detectar los productos de amplicón

[0016] Un método para controlar malezas en un cultivo o campo de evento de algodón MON 88913 que comprende los pasos de aplicar una cantidad efectiva de herbicida de glifosato al campo de algodón de MON 88913

[0017] Los aspectos anteriores y otros aspectos de la invención serán mas aparentes en las descripciones detalladas siguientes y en los dibujos acompañantes

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0018] Figura 1 Mapa de plásmido de pMON51915

[0019] Figura 2 Organización genómica del inserto en el evento de algodón MON 88913

[0020] Figura 3 5' secuencia de unión de DNA de MON 88913 (SEQ ID NO 1) y secuencia de unión de DNA 3' (SEQ ID NO 2)

[0021] Figura 4 5' región de DNA transgene/genómico de MON 88913 (SEQ ID NO 3)

[0022] Figura 5 3' región de DNA transgene/genómico de Mon 88913 (SEQ ID NO 4)

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS INCORPORACIONES PREFERIDAS

[0023] La presente invención se relaciona con el evento de algodón MON 88913 tolerante al glifosato, las composiciones contenidas en el, y el método para detección de la región de inserción del transgene/genómico en el evento de algodón MON 88913 y el progenie de él. Las siguientes definiciones y métodos son proveídos para definir mejor la presente invención y para guiar aquellos con habilidades normales en el arte en la práctica de la presente invención. A menos que se indique de otra manera, los términos y abreviaturas deben ser entendidos de acuerdo al uso convencional por aquellos de habilidades normales en el arte correspondiente. Definiciones de términos comunes en biología molecular pueden también ser encontradas en *Rieger et al*, *Glossary of Genetics: Classical y Molecular*, 5ta Edición, Springer –Verlag New York, 1991, y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press New York, 1994. La nomenclatura para las bases de DNA como se establecieron en 37 CFR § 1.822 es usada.

[0024] Como se usa aquí, el término "algodón" significa *Gossypium hirsutum* e incluye todas las variedades de la planta que pueden reproducirse con el evento de algodón MON 88913. La planta de la presente invención es una planta de algodón, mas específicamente la planta de algodón MON 88913.

[0025] Como se utiliza aquí, el termino "incluyendo (comprendiendo)" significa "incluyendo pero no limitado a".

[0026] Como se utiliza aquí, el término "cosecha" se refiere a las plantas cultivadas o partes de plantas, tales que crecen en el campo, lote, fila, invernadero, plano, o un contenedor.



[0027] "Glifosato" se refiere al N-fosfonometilglicina y sus sales. La N-fosfonometilglicina es un bien conocido herbicida que tiene actividad en un amplio espectro de especies de plantas. Glifosato es el ingrediente activo de Roundup® (Monsanto Co.), un herbicida seguro que tiene una deseable corta vida en el ambiente. Glifosato es el ingrediente activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Tratamientos con "herbicida glifosato" se refieren a tratamientos con los herbicidas Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otro herbicida que contenga glifosato. Ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin restricción, aquellos herbicidas vendidos por Monsanto Company como ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todos los cuales contienen glifosato y su sal isopropilamonio, aquellos vendidos por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato y su sal de amonio, ese vendido por Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio, y ese vendido por Syngenta Crop Protection como herbicida TOUCHDOWN®, el cual contiene glifosato y su sal trimetilsulfonio. Cuando se aplica a la superficie de una planta, el glifosato se mueve sistemáticamente a través de la planta. El glifosato es fitotóxico debido a la inhibición de las rutas de ácido shikímico, que provee un precursor para la síntesis de los amino ácidos. El glifosato inhibe la enzima sintasa 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímato (EPSPS) encontrada en la plantas. La tolerancia al glifosato puede ser lograda por la expresión de variantes bacteriales EPSPS y variantes de plantas EPSPS que tiene mas baja afinidad por el glifosato y en consecuencia retienen su actividad catalizadora en la presencia del glifosato (patente U S Nos 5,633,435, 5,094,945, 4,535,060 y 6,040,497).

[0028] Un "evento" transgénico es producido por la transformación de la célula de una planta con DNA heterólogo, por ejemplo, un constructo de ácido nucleico (pMON51915, Figura 1) que incluye un transgene de interés, regeneración de una población de

plantas resultado de la inserción del transgene dentro del genoma de la célula de la planta, y selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización particular del genoma. El término "evento" se refiere a la planta transformante original y el progenie del transformante que incluye el DNA heterólogo. El término "evento" también incluye el progenie producido por cruce sexual entre el evento y otra planta donde el progenie incluye el DNA heterólogo. Aun después de repetidos cruces con un padre recurrente, el DNA insertado y el DNA genómico de flaqueo del evento parental transformado esta presente en el progenie del cruce en la misma posición cromosomal. El término "evento" también se refiere a DNA del transformante original que comprende el DNA insertado, y la secuencia genómica de flaqueo inmediatamente adyacente al DNA insertado, que se espera sea transferido al progenie que recibe el DNA insertado incluyendo el transgene de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el DNA insertado (por ejemplo, el transformante original y el progenie resultante de autofecundación) y una línea parental que no contiene el DNA insertado.

[0029] La expresión de genes foráneos en plantas es conocido que esta influenciada por su posición cromosomal, tal vez debido a estructura cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o a la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, aumentadores) cerca del sitio de integración (Weising et al, Ann Rev Genet 22:412-477- 1988). Por esta razón, es a menudo necesario separar un gran número de eventos con el propósito de identificar un evento caracterizado por una expresión optima del gen introducido de interés. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre eventos. También puede haber diferencias en los patrones temporales y espaciales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgene en varios tejidos de la planta, que puede no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores transcripcionales presentes en el constructo génico introducido. Por esta razón, es común producir cientos a miles de

diferentes eventos y escrutarlos para tener un evento simple que tenga los niveles y patrones de expresión transgénica deseados para propósitos comerciales. Un evento que tiene un nivel o patrón deseado de expresión transgénica deseados es útil para introgresar el transgene en otros antecedentes genéticos mediante cruces sexual utilizando métodos de reproducción convencionales. Las progenies de tales cruces mantienen la expresión transgénica característica del transformante original. Esta estrategia es utilizada para asegurar una expresión confiable del gene en un número de variedades que sean bien adaptables a condiciones de crecimiento locales y las demandas del mercado.

[0030] Una planta de algodón tolerante al glifosato puede ser reproducido mediante el cruce de una primera planta de algodón parental, consistente de una planta de algodón obtenida de un célula de planta de algodón transgénico derivada de la transformación con el cartucho de expresión de la planta contenido en pMON51915 y que tolera la aplicación de herbicidas de glifosato, de esta manera produciendo una pluralidad de plantas de primer progenie, y luego seleccionando una planta de primer progenie que es tolerante al herbicida glifosato y autofecundando la planta de primer progenie, de esta manera produciendo unas plantas de segundo progenie y luego seleccionando de las plantas de segundo progenie una planta tolerante al herbicida glifosato. Estos pasos pueden incluir además un retro-cruce de la planta de primer progenie tolerante al glifosato o de la planta de segundo progenie tolerante al glifosato a una segunda planta de algodón parental o una tercera planta de algodón parental, de esta manera produciendo una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato. En la presente invención, la planta de algodón transgénica es también definida como evento de algodón MON 88913 y puede ser referido aquí como MON 88913.

[0031] También es entendido que dos plantas transgénicas diferentes pueden ser también aparejadas para producir un fruto que contiene dos genes exógenos adicionados segregando independientemente. Autofecundación de los progenies

apropiados puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes adicionados exógenamente. Retro cruce de una planta parental y cruce con una planta no transgénica son también contemplados, como lo es la propagación vegetativa. Descripción de otros métodos de reproducción que son comúnmente usados para diferentes rasgos y cultivos pueden ser encontrados en una de muchas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed, American Society of Agronomy, Madison WI (1987)

[0032] Una "sonda (probe)" es un ácido nucleico aislado al cual es adicionado un marcador convencional detectable o una molécula reportera, por ejemplo, un isótopo radioactivo, ligante, agente quimioluminocente o enzima. Tal sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una hebra de DNA genómico de MON 88913 ya sea de una planta MON 88913 o de una muestra que incluye DNA de MON 88913. Sondas de acuerdo a la presente invención incluyen no solo ácidos deoxiribonucleico y ribonucleico pero también poliamidas y otras materiales de prueba que enlazan específicamente a un DNA objetivo y que pueden ser usados para detectar la presencia de esa secuencia de DNA objetivo.

[0033] Primers de DNA son ácidos nucleicos aislados que son apareada a un hebra de DNA objetivo complementario mediante la hibridización del ácido nucleico para formar un híbrido entre el primer y la hebra de DNA objetivo, luego extendidos a lo largo de la hebra de DNA objetivo por una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de DNA. Una pareja de primers de DNA o un conjunto de primers de DNA de la presente invención se refieren al menos dos moléculas de primer de DNA útiles para amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro método convencional de amplificación del ácido nucleico.

[0034] Las sondas y primers son generalmente 11 polinucleótidos o mas en longitud, a menudo 18 polinucleótidos o mas, 24 polinucleótidos o mas, o 30 polinucleótidos o mas. Tales sondas y primers son seleccionados para ser de suficiente longitud para hibridizar específicamente a una secuencia objetivo bajo condiciones de hibridización altamente

restringidas , Preferiblemente, las sondas y primers de acuerdo a la presente invención tienen una completa similitud de secuencia con la secuencia objetivo, aunque sondas diferentes de la secuencia del objetivo que retienen la capacidad para hibridizar las secuencias objetivo pueden ser diseñadas por métodos convencionales

[0035] Métodos para preparar y usar sondas y primers son descritos, por ejemplo, en *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed , vol 1-3 Sambrook et al Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y, 1989 (aquí después "Sambrook et al, 1989"), *Current protocols in Molecular Biology*, ed, Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (aquí después "Ausubel et al, 1992"); y Innis et al., *PCR Protocols A guide to Methods and Applications*, Academic Press. San Diego, 1990, Parejas de PCR DNA primers pueden ser derivadas de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas de computadores desarrollados para tal propósito tal como Primer (Versión 0 5, ©, 1991, Whitehead Institute for Biochemical Research, Cambridge, MA)

[0036] Los primers y sondas basadas en el DNA genómico de flanco y secuencias transgénicas insertadas descubiertos aquí pueden ser usados para confirmar (si es necesario, para corregir) la secuencia DNA descubierta por métodos convencionales, por ejemplo, mediante aislamiento del DNA genómico de MON 88913, re-clonando las regiones transgene/genómicas y secuenciando tales moléculas de DNA

[0037] Las sondas de ácido nucleico y primers de la presente invención hibridizan bajo rigurosas condiciones a una molécula de DNA objetivo Cualquier método convencional de hibridización de ácido o método de amplificación puede ser usado para identificar la presencia de DNA de un evento transgénico en una muestra Moléculas de ácido polinucleico o fragmentos de ellas son capaces de específicamente hibridizar a otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Como se emplean aquí, dos moléculas de ácido nucleico se dice que son capaces de hibridizar específicamente una a la otra si las dos moléculas son capaces de formar un anti-paralela, estructura de ácido nucleico de doble hebra Una molécula de ácido nucleico se dice como "el

complemento" de otra molécula de ácido nucleico si ellas exhiben completa complementariedad. Como se usa aquí, se dice que las moléculas exhiben "completa complementariedad" cuando todo nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Dos moléculas se dicen de "mínima complementariedad" si ellas pueden hibridizar una a la otra con suficiente estabilidad para permitir que ellas permanezcan apareadas una a la otra bajo al menos condiciones convencionales de "baja rigurosidad". Similarmente, se dice que las moléculas son "complementarias" si ellas pueden hibridizar una a la otra con suficiente estabilidad para permitir que ellas permanezcan apareadas una a la otra bajo al menos condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Condiciones de rigurosidad convencionales son descritas por Sambrook et al, 1989, y por Haymes et al, Inc *Nucleic Acid Hybridization, A practical Approach* IRL Press, Washington, DC (1985). Separaciones de la completa complementariedad son en consecuencia permitidas, hasta tanto tales separaciones no eliminan completamente la capacidad de las moléculas para formar estructuras de doble hebra. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como un primer o una sonda es necesario que solo sea suficientemente complementario en secuencia para ser capaz de formar una estructura de doble hebra estable bajo las condiciones particulares de solvente y concentraciones de sal empleadas.

[0038] Como se emplea aquí, una secuencia de DNA homólogo sustancialmente es la secuencia de una molécula de DNA que hibridizará específicamente al complemento de una molécula del DNA objetivo al cual es comparada bajo condiciones de alta rigurosidad. Condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven hibridización de DNA, por ejemplo 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a cerca de 45 °C, seguido por lavado de 2.0 x SSC a 50 °C, son conocidas para aquellos habilidosos en el arte o pueden ser encontradas en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado puede ser seleccionada de una baja rigurosidad de cerca de 2.0 x SSC a 50 °C.

a una alta rigurosidad de cerca de 0.2 X SSC a 50 °C. Adicionalmente, la temperatura del paso de lavado puede ser incrementada de condiciones de baja rigurosidad temperatura ambiente de cerca de 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad de cerca de 65 °C. Ambas temperaturas y la sal pueden ser variadas, o la temperatura o la sal pueden ser mantenidas constantes mientras la otra variable es cambiada. En incorporación preferida, un ácido polinucleico de la presente invención específicamente hibridizará a una o mas moléculas de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO 3 o 4, complementos de ellos o fragmentos de cualquiera bajo condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a cerca de 2.0 x SSC y cerca de 65 °C. En una incorporación particularmente preferida, ácido nucleico de la presente invención específicamente hibridizará a una o mas moléculas de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO 3 o 4 o complementos o fragmentos de cualquiera bajo condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, un marcador preferido de molécula de ácido nucleico de la presente invención tiene una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO 1 o 2 o complementos de ellos o fragmentos de cualquiera. En otro aspecto de la presente invención, un marcador preferido de molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte una porción sustancial de la identidad de la secuencia con la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO:2, o complementos de ellos o fragmentos de cualquiera, donde la identidad de la secuencia esta entre 80% y 100% o 90% y 100%. En un aspecto adicional de la presente invención, un marcador preferido de molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 95% y el 100% la identidad de la secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID No 1 o SEQ ID NO 2, o complementos de ellas o fragmentos de cualquiera. Las SEQ ID NO 1 o SEQ ID No 2 pueden ser usadas como marcadores en métodos de reproducción de plantas para identificar el progenie de los cruces genéticos similar a los métodos descritos para análisis de marcador de DNA repetido de secuencia simple, en "DNA markers: Protocols, Applications, and overviews (1997) 173-185, Cregan et al, eds, Wiley-Liss NT, aquí incorporados por

referencia en su integridad La hibridización de las sondas a la molécula de DNA objetivo puede ser detectada por cualquier número de métodos conocidos a aquellos experimentados en el arte, estos pueden incluir, pero no se limitan a, gas fluorescente, marcadores radioactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quemiluminocentes

[0039] En relación a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo por PCR) usando una pareja de primers de amplificación particular, "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten al par de primer hibridizar solo a la secuencia de ácido nucleico objetivo a la cual un primer que tiene la secuencia correspondiente al tipo salvaje (o su complemento) se fijaría y preferiblemente para producir un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de DNA

[0040] El término " específico para (una secuencia objetivo)" indica que la sonda o el primer hibridizan bajo condiciones rigurosas de hibridización solo a la secuencia objetivo en una muestra que incluye la secuencia objetivo

[0041] Como se emplea aquí " DNA amplificado" o "amplicón" se refiere al producto del método de amplificación de ácido polinucleico dirigido a una molécula de ácido polinucleico objetivo que es parte de una plantilla de ácido polinucleico Por ejemplo, para determinar si una planta de algodón resultante de un cruce sexual contiene DNA genómico del evento transgénico de la planta del evento de algodón MON 88913 de la presente invención, el DNA que es extraído de la muestra de tejido de la planta de algodón puede ser sometido a un método de amplificación de ácido polinucleico usando un par primer que incluye un primer derivado de una secuencia de DNA en el genoma de la planta de MON 88913 adyacente al sitio de inserción del DNA heterólogo insertado (DNA transgénico) y un segundo primer derivado del DNA heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del evento de DNA MON 88913 El amplicón diagnóstico es de una longitud y tiene una secuencia de DNA que es también diagnóstico del evento El amplicón puede variar en longitud desde

la longitud combinada del par de primers mas un par de nucleótido base, preferiblemente mas cerca de cincuenta pares de nucleótidos base (bps), mas preferiblemente mas cerca de doscientos cincuenta pares de nucleótidos base, y aún mas preferiblemente cerca de cuatrocientos cincuenta pares de nucleótidos base o mas Alternativamente, un par de primer puede ser derivado de la secuencia genómica en ambos lados del DNA heterólogo insertado para así producir un amplicón que incluye la integridad de la secuencia polinucleótido inserta, (por ejemplo, un primer delantero aislado de una porción genómica de SEQ ID No 3 y un primer reverso aislado de una porción genómica de SEQ ID NO. 4 que amplifica la molécula de DNA que incluye los dos cartuchos de expresión de fragmento de DNA pMON51915 que fue insertado en el genoma de MON 88913, el inserto incluyendo cerca de 8,512 bps del inserto, Figura 2) Un miembro de una pareja de primer derivado de una secuencia genómica de la planta puede ser localizado a una distancia de la secuencia de DNA insertada, esta distancia puede varias desde un par nucleótido base hasta cerca de veinte mil pares nucleótido base. El uso del término "amplicón" específicamente excluye primers opacadores que pueden ser formados la reacción de amplificación térmica de DNA

[0042] Amplificación de ácido nucleico puede ser lograda por cualquiera de los varios métodos de amplificación de ácido polinucleico conocidos en el arte, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Los métodos de amplificación son conocidos en el arte y son descritos, *inter alia*, en la Patente US No 4,683,195 y 4,683,202 y en *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*, ed Innis et al., Academic Press , San Diego 1990. Métodos de amplificación PCR han sido desarrollados para amplificar hasta 22 kb (kilobase) de DNA genómico y hasta 42 kb de DNA bacteriofago (Cheng et al , Proc Natl. Acad Sci USA 91 5695-5699,1994) Estos métodos así como otros métodos conocidos en el arte de la amplificación de DNA pueden ser usados en la práctica de la presente invención. La secuencia del DNA heterólogo inserto o flanqueando la secuencia de DNA genómico de MON 88913 puede

ser verificada (y corregida si es necesano) mediante la amplificación de tales moléculas de DNA de semillas o plantas de MON 88913 crecidas de las semillas depositadas con el ATCC que tiene No de acceso PTA-4854, usando primers derivados de la secuencia proveída aquí, seguido de secuenciado de DNA estándar del amplicón PCR o fragmentos de DNA clonados de el Los kits de detección de DNA que son basados en métodos de amplificación de DNA contienen DNA primers que específicamente amplifican el amplicón de diagnóstico El kit puede proveer un método de detección basado en gel de agarosa, puntotinal Taqman®, o cualquier número de métodos de detectar el amplicón de diagnóstico que son conocidos en el arte Un kit que contiene DNA primers que son homólogos o complementarios de cualquier porción de SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 es un objeto de la invención

[0043] El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado por una pluralidad de técnicas Uno de tales métodos es Análisis de Bit Genético (nikiforo, et al Nucleic Acid Res. 22 4167-4175,1994) donde un oligonucleótido de DNA es diseñado que translapa ambos la secuencia de DNA genómico de flaqueo y la secuencia de DNA insertada El oligonucleótido es inmovilizado en columnas de un plato microtiter Después de PCR de la región de interés (usando un primer en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flaqueo adyacente), un producto de PCR de hebra sencilla puede ser hibridizado al oligonucleótido inmovilizado y servir como una plantilla para una reacción de extensión base singular usando una polimerasa de DNA y marcando trifosfatos de dideoxinucleótido (ddNTPs) específico para la base próxima esperada La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA Una señal indica la presencia de secuencia transgene/genómica debido a la exitosa amplificación, hibridización y extensión de base singular

[0044] Otro método es la técnica es la técnica del pirosuenciado como es descrito por Winge (Innov, Pharma. Tech 00 18-24. 2000) En este método un oligonucleótido es diseñado que translapa el DNA genómico adyacente y la unión de DNA inserto El oligonucleótido es hibridizado a un producto PCR de hebra simple de la región de

interés (un primer en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flaqueo) e incubado en la presencia de una polimerasa de DNA, ATP, sulfunilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Trifosfatos de deoxinucleótido (dNTPs) son adicionados individualmente y la incorporación resulta en una señal de luz que es medida. La señal de luz indica la presencia de una secuencia transgene/genómica debido a la exitosa amplificación, hibridización, y extensión de base múltiple o singular.

[0045] Polarización fluorescente como es descrita por Chen et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un método que puede ser usado para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este método un oligonucleótido es diseñado el cual traslapa el flaqueo genómico y la unión de DNA insertado. El oligonucleótido es hibridizado a un producto PCR de hebra simple de la región de interés (un primer en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flaqueo) e incubado en la presencia de una polimerasa de DNA y un ddNTP fluorescentemente marcado. La extensión de base singular resulta en la incorporación de la ddNTP. La incorporación puede ser medida como un cambio en polarización usando un fluorómetro. Un cambio en polarización indica la presencia de la secuencia transgene/genómica debido a la exitosa amplificación, hibridización y extensión de base singular.

[0046] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) es descrito como un método de detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de DNA y es completamente entendible en las instrucciones proveídas por el fabricante. Brevemente, una sonda de oligonucleótido FRET es diseñada que traslapa el flaqueo genómico y la unión de DNA inserto. La sonda FRET y los primers PCR (un primer en la secuencia de DNA inserta y uno en la secuencia genómica de flaqueo) son ciclados en la presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. Hibridización de la sonda FRET resulta en separación y liberación del moiety fluorescente del moiety de apagado en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia transgene/genómica debido a la exitosa amplificación e hibridización.

[0047] Los beacons moleculares han sido descritos para ser usado en la detección de secuencias como se describe en Tyangi, et al (Nature Biotech 14 303-308,1996) Brevemente, un sonda de oligonucleótido FRET es diseñada que translapa el flaqueo genómico y al unión de DNA inserta. La estructura única de las sonda FRET resulta en que ella contiene una estructura secundaria que mantiene los moieties fluorescentes y de apagado a cercana proximidad. La sonda FRET y los primers PCR (un primer en la secuencia de DNA inserta y uno en la secuencia genómica de flaqueo) son ciclados en la presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. Luego de la amplificación exitosa de PCR, hibndización de la sonda FRET al secuencia objetivo resulta en la remoción de la estructura secundaria de la sonda y en la separación espacial de los moieties fluorescente y de apagado. Una señal fluorescente resulta. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserto flaqueo/transgene debido a una exitosa amplificación e hibridización.

[0048] Kits de detección de DNA pueden ser desarrollados usando los compuestos expuestos aquí y los métodos bien conocidos en el arte de la detección de DNA. Los kits son útiles para la identificación del DNA del evento de algodón MON 88913 en una muestra y puede ser aplicado a métodos para reproducir plantas de algodón que contengan DNA de MON 88913. Los kits contienen secuencias de DNA que son útiles como primers o sondas y que son homólogos o complementarios a cualquier porción de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO 4 o a secuencias de DNA homólogas o complementarias al DNA contenido en cualquiera de los elementos genéticos transgénicos de pMON51915 que han sido insertados en DNA de MON 88913 (Figura 2). Estas secuencias de DNA pueden ser usadas en métodos de amplificación de DNA (PCR) o como sondas en métodos de hibridización de ácido polinucleico, por ejemplo, el análisis Southern o el análisis northern. El elemento genético transgénico contenido en el DNA de Mon 88913 (figura 2) incluye un primer cartucho de expresión que comprende el promotor mosaico Figwort construido como un elemento promotor quimérico con el factor de elongación *Arabidopsis* 1-alpha (At.Efla) promotor (FMV35S/Efl, patente U S &,462,258 SEQ ID

NO 28, incorporada aquí por referencia en su integridad), operablemente ligado al factor *Arabidopsis* 1-alpha líder translacional e intron (Genbank número de acceso X16430, como se describe en Axelos *et al.*, *Mol Gen. Genet* 219 106-112,1989), operablemente ligado a al *Arabidopsis* EPSPS péptido de transito cloroplasto (TS-At EPSPS CTP2,Klee *et al* , *Mol Gen Genet* 210 47-442,1987), operablemente ligado a un glifosante tolerante sintasa de 5-enolpiruvilshikimato-2-fosfato (EPSPS) de *Agrobacterium sp* variedad CP4 (aroA CP4, patente U.S 5,633,435) operablemente ligado a la 3' región de terminación de ribulosa pea Carboxilasa E9 de 1,5-bifosfato (T-Ps RbsS2 E9, Coruzzi, *et al* , *EMBO J* 3:1617-1679,1984), y un segundo cartucho que comprende el promotor CaMV35S-Act8 que incluye el primer intron del gen Act8 (SEQ ID No 29, patente U.S 6,462,258) operablemente conectado a una péptida de transito cloroplasto *Arabidopsis* EPSPS (TS-At.EPSPS CTP2), operablemente conectado a la glifosato tolerante sintasa de 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) de *Agrobacterium sp* variedad CP 4(aroA:CP4, patente U S 5,633,435, incorporada aquí por referencia en su integridad), operablemente ligada a la 3' región de terminación ribulosa pea Carboxilasa E9 de 1,5-bifosfato.

[0049] Los siguientes ejemplos son incluidos para mostrar ejemplos de ciertas incorporaciones preferidas de la invención. Debe ser apreciado por aquellos con habilidad en el arte que las técnicas expuestas en los ejemplos que siguen representan aproximaciones que la invención ha encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención, y así pueden ser consideradas para constituirse en ejemplos de modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos con habilidad en el arte deben, a la luz de la presente invención, apreciar que muchos cambios pueden ser hechos en las incorporaciones específicas que son expuestas y todavía obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0050] El evento de algodón transgénico MON 88913 fue generado por una transformación *Agrobacterium* mediada de células de algodón con fragmentos de DNA derivados de pMON51915 (Figura 1) El constructo de transformación de la planta, pMon51915 fue apareado en *Agrobacterium* usando un procedimiento de apareamiento triparental (Ditta et al, Proc Natl Acad Sci 77 7347-7351, 1980) La transformación de células de algodón con transgénicos puede ser realizada usando los métodos descritos, por ejemplo, en la patente U S 5,004,863, patente U S 5,159,135 y en la patente U S 5,518,908, incorporadas aquí por referencia en su integridad La transformación de algodón es realizada esencialmente como se describe en WO/0036911 o como se describe en la patente U S 5,846,797, incorporada aquí por referencia en su integridad. Una modificación de estos métodos puede incluir, pero no se limita al siguiente ejemplo La semilla Coker 130 es esterilizada en superficie y germinada en oscuro Explantas de hypocotilos son cortadas de las semillas germinadas en longitudes de 1-1,5 centímetros. *Agrobacterium tumefaciens* variedad ABI transformado para que contenga pMON51915 es cultivado en caldo de Luria sin antibióticos por 6 horas a 28 °C, luego diluido a aproximadamente 2×10^8 bacterias/mililitro (ml) La explanta de hipocotilo es sumergida en *Agrobacterium* inoculador por 2 –5 minutos, luego cultivada por cerca de 45 horas en MS+1 9 mg/l KNO₃+3%glucosa (TRM), 30 explantas por plato, 24C, en la oscuridad Las explantas son transferidas a TRM que contiene 150 mg/l de cefotaxima y 300 EM de glifosato por cuatro periodos de cultivo, cada período de aproximadamente seis semanas Calli embriogénico es segregado de la explanta primaria al final del tercer o cuarto período de cultivo y colocado en el mismo medio. El calli embriogénico son subcultivados una vez mediante una breve suspensión en liquido TRM+ 3%glucos, seguido por vertimiento de la suspensión en 'TRM' + 150 mg/l de cefotaxima + 300, uM platos de glifosato Los embriones somáticos son cultivados 3-8 semanas después del subcultivo liquido, luego crecidos en medio Stewart y Hsu con 0.5% de glucosa Plantitas derivadas de los

embriones somáticos son maduras acerca de 4-7 cm (3-6 hojas) en cajas de Magenta con Stewart & Hsu modificado con 40mM NO₃/10mM NH₄ + 2% de sucrosa. Estas plantas son luego transplantadas a vasijas de suelo, vasijas de 4", humedad del 100%, 16 horas de luz por día, por 4 – 6 días, seguido por 50% de humedad 5 –10 días.

[0051] Los fragmentos de DNA de pMON51915 contienen dos cartuchos de expresión transgénica dentro del genoma de MON 88913 (Figura 2) que colectivamente le confieren la tolerancia al glifosato del MON 88913 y las progenies del el.

[0052] Las semillas y plantas de MON 88913 tienen partes regenerable. Las partes regenerables de la semilla incluyen, pero no se limitan al embrión, el cotiledón, y el meristemo del tallo o la raíz. Las partes regenerables de la planta incluyen pero no se limitan a las hojas, el petiolo, el hipocotilo, secciones del tallo, y el meristemo apical y raíz. La invención puede incluir partes de planta del evento de algodón MON 88913 que incluyen, pero no se limitan, a polen, óvulo, flores, cápsulas, lint, tallos, raíces y hojas. La invención también incluye componentes extractables de semilla de MON 88913 que incluyen, pero no se limitan a proteína, harina, vainas, aceite o hilazas.

EJEMPLO 2

El evento de algodón MON 88913 tolerante al glifosato fue seleccionado de muchos eventos de algodón transgénico para tolerar el daño reproductivo y vegetativo del glifosato. La producción exitosa de un evento transgénico de calidad comercial requiere actualmente la producción de un gran número de eventos transgénicos. En la presente invención, MON 88913 fue un evento entre aproximadamente 1000 eventos R0 que habían sido transformados con muchos constructos DNA diferentes que incluyen pMON51915. El evento MON 88913 fue seleccionado de muchos eventos por una serie de análisis moleculares y separaciones por tolerancia al glifosato.

[0054] Los eventos fueron separados en un invernadero de ensayo para la tolerancia al glifosato, siendo las plantas calificadas por su tolerancia reproductiva y vegetativa.

Quince a veinticinco semillas R_1 de cada evento fueron plantadas en bandejas de 15 celdas con medio de crecimiento Metro-Mix 350, que contiene una combinación de turba, vermiculita, nutrientes, agentes humectantes y ceniza y corteza procesada. Fertilizantes adicionales incluidos en el medio fueron Osmocote 14-14-14, Osmocote Plus 15-9-12, y micronutrientes MicroMax. Todas las plantas fueron crecidas en el invernadero. La temperatura promedio de día durante la estación de crecimiento fue de 32 grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$) mientras que la temperatura de noche fue de 24 $^{\circ}\text{C}$. El fotoperíodo fue fijado en 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad, con intensidad de luz máxima. La humedad relativa promedio durante el ciclo de crecimiento fue 45 por ciento. Las plantas fueron luego rociadas a las etapas de las 4 y 8 hoja secuencialmente con 48 oz/A (oz=onzas, A=acre) de Roundup Ultra® (herbicida que contiene glifosato). Después de siete días de la aplicación de la 4-hoja, las plantas fueron calificadas por daño vegetativo y segregaciones del fenotipo de tolerancia al glifosato fueron recogidas. Estos datos fueron usados para confirmar que el evento de inserto transgénico estaba comportándose como un gen dominante único, adhiriéndose a los modelos genéticos Mendelian. Los eventos con buena tolerancia vegetativa fueron subsecuentemente transplantados en vasijas de 10 pulgadas con el mismo medio de crecimiento Metro-Mix 350 descrito arriba y crecidos hasta su maduración. Las plantas fueron tratadas con Px Plus (BASF, Research Triangle Park, NC) como se necesitaba para regular la altura de la planta. A los tres meses de la plantación, las plantas fueron mapeadas por la retención de las cápsulas en la primera posición de frutación de las primeras 5 ramas de frutación. El máximo valor de retención para este mapa de plantas es 5 (cinco cápsulas retenidas). Esto proveyó una medida rápida e indirecta de la fertilidad de la planta. Con esta separación de invernadero, la retención promedio para el evento comercial actual (algodón RR 1445) es menor de 10. Eventos con un promedio de retención de cápsulas mas grande o igual a tres fueron recogidas y llevadas a un evento de selección adicional. Eventos que tienen valores de retención

mas grande o igual a dos tienen valor como nuevas selecciones de planta con tolerancia al glifosato

[0055] Los eventos que cumplieron los criterios de tolerancia vegetativa y reproductiva al Roundup® Ultra fueron analizadas para número de copia a través el análisis Southern Blot. Eventos de copia única que mostraron buena tolerancia en el experimento de invernadero inicial fueron caracterizados adicionalmente en 1) ensayos de invernadero de tolerancia al glifosato con tasas de glifosato mas altas, 2) ensayos de replicación en terreno, y 3) separaciones moleculares adicionales. Los ensayos de tolerancia en invernadero fueron conducidos usando plantas homocigotas. Todos los experimentos contuvieron el comercialmente disponible Roundup Ready® el evento de algodón 1445 (estándar comercial) para comparación. Las semillas fueron plantadas en bandejas de 15 celdas y tratadas con 64 oz/A de Roundup Ultra® en la etapa de la 4-hoja y 96 oz/A en la etapa de la 8-hoja. Las plantas fueron luego transplantadas a vasijas de 10 pulgadas y cuatro plantas fueron mapeadas a la mitad de la estación en la primera posición de fructación de las primeras cinco ramas de fructación. Los datos del final de la estación también fueron recogidos e incluyeron el pesaje de la semilla de algodón, número de cápsulas, tamaño de la cápsula y retención de cápsulas.

[0056] Los ensayos de campo fueron usados para seleccionar el evento que mostró mejores tasas de crecimiento, retención de fruto y producción. Las pruebas de campo fueron arregladas en un lote partido aleatoriamente con tres replicaciones y tres tratamientos. Los eventos fueron plantados en dos filas, lotes de 30 pies. Los tratamientos consistieron de Roundup Ultra® no rociado, 64 oz/A (1.5 lb ae/A) a los 4,6, 10, 14 etapas nodales, y 96 oz/A (2.25 lb ae/A) de Roundup Ultra® a las 4,6, 10, 14 etapas nodales. Un mapa de las plantas de mitad de la estación fue realizado sobre 10 plantas por lote. Datos de retención de cápsulas fueron recogidos para la primera y segunda posición de fructificación de los primeros cinco nodos de fructificación que proveen un valor de retención de capsulas de 1 – 10. Una planta con un valor de

retención de cápsula igual o mas grande que tres en una escala de 0 –10, tiene un valor como una nueva selección de planta tolerante al glifosato

[0057] Pruebas de campo (10 locaciones) comparando la producción de motas de algodón (libras/acre, lb/A) de MON 88913 y algodón RR 1445 mostraron que el MON 88913 proveyó una protección sustancial contra los efectos del glifosato (libras de ácido equivalente/acre, lb ae/A) en la producción (Tabla 1) La producción es una medida de la retención de capsulas, plantas de algodón ingeniadas para ser glifosato tolerante que retienen un número sustancial de cápsulas en la primera y segunda posición de frutificación mantendrán una ventaja en producción sobre plantas de algodón que no son tal tolerantes al glifosato. Una dosis efectiva de un herbicida que contiene glifosato para controlar maleza en el campo de MON 88913 comprende 4 oz/A y puede exceder 128 oz/A dpnendiendo de las especies de malezas a ser controladas y la etapa de desarrollo de la maleza El glifosato puede ser mezclado con otros herbicidas para aumentar la actividad herbicida contra cierto tipo de malezas.

Tabla 1 Comparación de la Producción de Motas de MON 88913 y 1445 después del Tratamiento con Glifosato

Tratamiento de Glifosato	0 lb ae/A	1.5 lb ae/A	2 25 lb ae/A
1445	2421 84	1044 19	831 47
MON 88913	2551 58	2587 61	2412.3

EJEMPLO 3

[0058] DNA genómico de algodón para todas las reacciones PCR y analizas Southern blot fue aislado usando el procedimiento CTAB (Rogers et al , Plant Mol Bio 5 69-76,

100

1985) o Kit de planta Dneasy™ 96 (Cat # 69181, Qiagen Inc , Valencia CA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes Tejido de hoja fue recogido de plantas en la etapa 2-4 hoja Las mas pequeñas verdaderas hojas fueron recogidas de cada planta e inmediatamente congeladas en hielo seco DNA fue extraído usando, por ejemplo, el siguiente método. El tejido fue molido utilizando cuentas de plástico con nitrógeno líquido 5 ml de amortiguador de extracción fueron adicionados a 0.75 mg (g) de tejido e incubado a 55 °C por 45 minutos La amortiguadora de extracción CTAB consistió de 100 mM Tris pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 2 % CTAB con la adición de 5 µl (microlitro) de beta-mercaptoetanol, 5 µl de Rnase y 1 % PVPP Las muestras fueron luego extraídas con un volumen igual de cloroformo (5ml) y luego centrifugadas a 3700 RPM por 15 minutos a temperatura ambiente La fase acuosa fue trasferida a un nuevo tubo y el DNA fue precipitado con un volumen igual de isopropanol Después de centrifugación a 3700 RPM por 15 minutos, las pelotitas fueron lavadas con etanol al 70% , secadas al aire, y resuspendidas en 250 µl de agua

[0059] DNA genómico de algodón adyacente a la inserción transgénica fue obtenido para el evento MON 88913 utilizando TAIL-PCR (Liu et al., Plant Journal 8 457 – 463,1995) La extensión del DNA genómico fue conducida usando el kit Genome Walker (CloneTech Laboratones, Palo Alto, CA) siguiendo los protocolos del fabricante Brevemente, el DNA (~5 µg) aislado utilizando el protocolo CTAB descrito anteriormente, fue digerido con varias endonucleasas de restricción (EcoRV, Scal) a 37 °C de una día para otro en un volumen total de 100 µl Las endonucleasas de restricción fueron removidas con columnas de purificación PCR QIAquick (cat # 28104, Qiagen, Inc) La ligazón de las moléculas adaptadoras fueron esas que estaban descritas en el protocolo del fabricante. DNA fue amplificado usando un primer FMV-1 (SEQ ID NO 5) con el primer AP1 (CloneTech Laboratories) para la reacción primaria y primer FMV-2 anidado (SEQ ID NO 6) con el primer AP2 (CloneTech Laboratories) para la reacción secundaria.

[0060] El DNA transgene/genómico 3' del MON 88913 fue aislado utilizando PCR inversa. El total de DNA genómico (~10µg) fue digerido con tres enzimas de restricción; *Bell*, *NcoI* y *HindIII*. Las columnas de purificación PCR QIAquick fueron usadas para purificar el DNA después de la digestión de un día para otro a 37 °C. El DNA fue decantado de la columna con 50 µl de agua y luego diluido a 1 ml. El decantado diluido (85 µl) fue combinado con 10 µl de amortiguador (10X) y 5 µl de ligasa T4 para circular los fragmentos. Después de incubación de un día para otro a 16 °C, la ligasa fue inactivada por calor a 70 °C. Las muestras fueron amplificadas mediante PCR con una serie de primers anidados. La combinación de primers para PCR incluyó par primer 8099-E9-1/E9-2 (SEQ ID NO:7/SEQ ID NO 8) para muestras *Bell* y *NcoI* par primer 8099-E9-1/E9-2 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO 11) para muestras *Bell* y *NcoI* y 8099-E9-3/Act 8 (SEQ ID NO 13/SEQ ID NO 12) para la muestra *HindIII*. La condición para el PCR incluyó, PCR primario = 7 ciclos de 94 °C por 2 segundos, 72 °C por 10 minutos; 37 ciclos de 94 °C por 2 segundos, 67 °C por 10 minutos; 1 ciclos de 67 °C por 10 minutos, PCR secundario y terciario = 5 ciclos de 94 °C por 2 segundos, 72 °C por 10 minutos, 24 ciclos de 94 °C por 2 segundos; 67 °C por 10 minutos, 1 ciclo de 67 °C por 10 minutos.

[0061] Alternativamente, la amplificación de DNA por PCR del extremo 3' del evento MON 88913 puede ser realizado con condiciones que incluyen 7 ciclos de 94 °C por 25 segundos, 72 °C por 3 minutos; 37 ciclos de 94 °C por 2 segundos, 67 °C por 4 minutos, 1 ciclos de 67 °C por 7 minutos. Todos los amplicones son visualizados sobre gel de agarosa la 0.8 % manchado con bromuro de etidio. El DNA es preparado para secuenciado o por purificación las muestras de PCR directamente con el kit de purificación PCR QIAquick (cat # 28104, Qiagen Inc) o por extracción del fragmento apropiado del gel y usando el kit de Extracción de Gel QIAquick (car # 28704 Qiagen Inc).

[0062] Una serie de primers de DNA fueron diseñados para secuenciar el inserto transgénico y las regiones genómicas de flanco adyacentes del MON 88913. Los

primers de DNA fueron diseñados así que permitieran amplificación de la totalidad de las regiones transgene y genómica de flanco mediante cinco fragmentos traslapándose. Primers únicos fueron diseñados para permitir la amplificación de cada región EPSPS-CTP2/*aroA*-CP4/RbcS2 E9 separadamente. Para todos los fragmentos usados en el secuenciado, las amplificaciones fueron realizadas en triplicado. Las combinaciones de parejas de primers de DNA usados como primers secuenciadores para la región 5' transgene/genómica (SEQ ID NO 1 Y SEQ ID NO 15), la región 3' transgene/genómica (SEQ ID NO 16 Y SEQ ID NO 17) y los elementos genéticos insertos (SEQ ID NO. 18 Y SEQ ID NO 11, SEQ ID NO: 19 Y SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 20 Y SEQ ID NO-11). El total de DNA genómico fue usado para todas las reacciones de PCR. Todos los amplicones fueron visualizados sobre gel de agarosa al 0.8 % manchado con bromuro de etidio. El DNA fue preparado para secuenciado o por purificación de la muestra de PCR directamente con el kit de purificación PCR QIAquick o por extracción del fragmento apropiado del gel y utilizando el kit de Extracción de Gel QIAquick. La secuencia de DNA fue producida usando equipo de análisis de secuencia de DNA (ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) y software de análisis de secuencia DINASTAR (DINASTAR Inc, Madison, WI).

[0063] Los fragmentos de DNA de las regiones del flanco del inserto transgene/genómico de MON 88913 fueron subclonadas usando un kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). La secuencia de DNA de la región 5' transgene/genómica es mostrada en la Figura 4 y la secuencia de la región 3' transgene/genómica es mostrada en la Figura 5. En las secuencias genómicas mostradas en Figuras 4 y 5, la secuencia del inserto transgene está en *itálicas*.

EJEMPLO 4

[0064] Parejas de primers del evento de DNA son usadas para producir un amplicón de diagnóstico para el genoma del evento de algodón MON 88913. Amplicones de diagnóstico para el genoma MON 88913 comprenden al menos una secuencia de

unión, SEQ ID NO 1 O SEQ ID NO 2 . Parejas de primers del evento que producirán un amplicón de diagnóstico para el MON 88913, las parejas de primers incluyen, pero no se limitan a SEQ ID NO 14 Y SEQ ID NO 15 para la 5' secuencia de amplicón , y SEQ ID NO 16 Y SEQ ID NO 17 para el 3' amplicón cuando se utilizan en el protocolo delineado en la Tabla 2. En adición a estas parejas de primers, cualquier pareja de primer, homólogo o complementaria a SEQ ID NO 3 O SEQ ID NO 4, que en la reacción de amplificación de DNA produce un amplicón de diagnóstico para el genoma de MON 88913 es un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula de primer polinucleótido de DNA aislada que comprenda al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO. 3, o su complemento que sea útil en el método de amplificación de DNA para producir un amplicón de diagnóstico para el MON 88913 es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de primer polinucleótido de DNA aislada que comprenda al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO. 4, o su complemento que sea útil en el método de amplificación de DNA para producir un amplicón de diagnóstico para el MON 88913 es un aspecto de la invención. Un ejemplo de las condiciones de amplificación para esta análisis es ilustrado en la Tabla 2 y la Tabla 3, sin embargo, cualquier modificación de estos métodos que usen primers de DNA homólogos o complementarios a SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o secuencias de DNA de los elementos genéticos contenidos en el inserto transgene de MON 88913 que producen un amplicón de diagnóstico para MON 88913, está dentro de las posibilidades normales del arte. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de DNA homologa o complementaria a al menos un DNA de unión transgene/genómica (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) o una porción sustancial de él.

[0065] Un análisis para muestra de tejido de planta del evento MON 88913 debe incluir un control positivo de tejido del evento MON 88913, un control negativo de un algodón que no es evento MON 88913, y un control negativo que no contiene DNA genómico. Secuencias de primer adicionales pueden ser seleccionadas de SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 por aquellos hábiles en el arte de los métodos de amplificación de

DNA y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón por los métodos mostrados en la Tabla 2 y la Tabla 3 pueden diferir, pero resultan en un amplicón de diagnóstico para el evento MON 88913. El uso de estas secuencias de primer de DNA con modificaciones a los métodos de las Tablas 2 y 3 están dentro del alcance de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia de primer de DNA derivada de SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4, que es diagnóstico para el MON 88913 es un aspecto de la invención.

[0066] Kits de detección de DNA que contienen al menos un primer de DNA derivado de SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO.4 que cuando se usan en un método de amplificación de DNA produce un amplicón de diagnóstico para Mon 88913 es un aspecto de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia de primer derivada de cualquiera de los elementos genéticos de Pmon51915 que sea diagnóstico de MON 88913 es un aspecto de la invención. Una semilla o planta de algodón, donde su genoma produzca un amplicón que comprende SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 cuando es ensayado en un método de amplificación de DNA es un aspecto de la presente invención. El ensayo para el amplicón de MON 88913 puede ser realizado mediante el empleo de un Stratagen Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler Gradient termociclador como se muestra en la Tabla 3, o por métodos y aparatos conocidos a aquellos hábiles en el arte.

Tabla 2- Procedimiento PCR y condiciones de reacción de la mezcla para la identificación de la región de unión transgene inserto/genómico 3' de MON 88913

Paso	Reagente	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Adicionar hasta volumen final de 20 µl	—
2	10X amortiguador de reacción (con Mg Cl ₂)	2.0 µl	1X concentración final de amortiguador , 1.5

			mM concentración final de Mg Cl ₂
3	10 mM de solución dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0.4 µl	200 µM concentración final de cada dNTP
4	Primer de evento (SEQ ID NO.14) (resuspendido en 1 X TE amortiguador o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0.4 µl	0.2 µM concentración final
5	Primer de evento (SEQ ID NO 15) (resuspendido en 1X TE amortiguador o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0.4 µl	0.2 µM concentración final
6	Rnase, libre de Dnsa (500 ng/µl)	0.1 µl	50 ng/reacción
7	Polimerasa de DNA <i>REDTaq</i> (1 unit/µl)	1.0 µl (recomendado cambiar las pipetas antes del próximo paso)	1 unidad/reacción
8	DNA extraído (plantilla) ▪ Muestras para ser analizadas ○ Hojas individuales ○ Hojas acumuladas (maximo 50 hojas/acumulación) ▪ Control Negativo ▪ Control Negativo	○ 10-200 ng de DNA genómico ○ 200 ng de DNA genómico ○ 50 ng de DNA de algodón genómico (no MON 88913) ○ No plantilla de DNA	

	▪ Control Positivo	○ 50 ng de DNA genómico de MON 88913	
9	Mezclar suavemente y adicionar 1 –2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción		

Tabla 3 Parámetros de PCR sugeridos para Diferentes Termocicladores

[0067] Proceda con la amplificación de DNA en un Stratagen Robocycler, MJ Engine, Perkin –Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient termociclador, usando los siguientes parámetros de ciclado. Los termocicladores MJ Engine o Eppendorf Mastercycler Gradient deben ser operados en una manera calculada. Opere el termociclador Perkin-Elmer 9700 con la velocidad de rampa fijada en el máximo.

Ciclo No	Parámetros Stratagen Robocycler
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 1 minuto 60 °C 1 minutos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

Ciclo No	Parámetros MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94 °C 3 minutos

38	94 °C 10 segundos 60 °C 30 segundos 72 °C 1 minuto
1	72 °C 10 minutos

Ciclo No	Parámetros Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 15 segundos 60 °C 15 segundos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

EJEMPLO 5

[0068] DNA genómico de Mon 88913 y DNA genómico de algodón de control (~ 15µg de cada uno) es digerido con varias enzimas de restricción (140 U) en un volumen total de 150 µl del amortiguador del fabricante correspondiente (NEB, Beverly, MA) Endonucleasas de restricción, por ejemplo, BglII, BamHI, NcoI, HindIII y BclI, son usadas en el análisis Southern de MON 88913 La digestión de endonucleasas es realizada a la temperatura apropiada por al menos 6 horas Después de incubación, el DNA es precipitado con 3M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol. Subsecuentemente, el DNA es lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en 40 µl de TBE Amortiguador de carga (0.2X) es adicionado a las muestras y se realiza una electroforesis sobre gels de agarosa (8 %) por 16 – 18 horas a 30 voltios. Los geles fueron manchados con bromuro de etidium, luego tratadas con una solución de depuración (0.125 N HCl) por 10 minutos Con una solución de denaturalización (0.5 M de hidróxido de sodio, 1.5 M de cloruro de sodio) por 30 minutos , y finalmente con una solución neutralizante (0.5 M de base Trizma, 1.5 M cloruro de sodio) por 30 minutos El DNA es transferido a una membrana Hybond-N (American Pharmacia

Biotech, Buckinghamshire, England) usando un turbomanchador (Schleicher y Schuell, Dassel, Germany) por 4-6 horas y luego fijado a una membrana usando luz UV

[0069] Las membranas son prehibridizadas con 20 ml de solución DIG Easy Hyb (Roche Molecular Biochemicas, Indianapolis, IN, cat # 1603558) por 2 –4 horas a 45 °C. Sondas de DNA radioactivas (^{32}P dCTP) homólogas o complementarias a SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO.2 o SEQ ID NO 3, o SEQ IDE NO 4, o una porción de ellas son hechas usando el kit de marcación de DNA Radprime (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 18428-011). Nucleótidos no incorporados son removidos usando columnas G-50 sephadex (Invitrogen). La solución de prehibridización es reemplazada con 10 ml de solución pre calentada DIG Easy HYb que contiene la sonda desnaturalizada a una concentración final de 1 millón de conteos por ml. Las manchas son hibridizadas a 45 °C por 16 – 18 horas

[0070] Las manchas son lavadas con una solución de baja rigurosidad (5X SSC, 0.1XSDS) a 45 °C y luego repetidamente lavadas con una solución de alta rigurosidad (01 XSSC, 0.1% SDS) a 65 °C. Las manchas son expuestas en un pantalla de fósforo (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) por mas de 2 horas y la exposición leída usando una maquina de Tormenta de Datos 860 (Storm Data machine) (Amersham Bioscience)

EJEMPLO 6

[0071] Los métodos utilizados para identificar progenies de algodón heterozigos de homozigos que contienen el evento MON 88913 son descritos en un ensayo de zigocidad para los cuales ejemplos de las condciones son descritos en las Tablas y Tabla 5. Los primers usados en los ensayos de zigocidad son primer SQ 1099 (SEQ ID NO:21), SQ 1100 (SEQ ID NO 22), SQ 1353 (SEQ ID NO 23), primer marcado 6FAMTM (SEQ ID NO 24), y primer marcado VICTM (SEQ ID NO 25), 6 FAM and VIC son productos colorantes fluorecentes de Apllied Biosystems (Foster City, CA) fijados a l primer de DNA

[0072] SEQ ID NO 21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO 23, cuando son usadas en estos métodos de reacción producen un amplicón de DNA para algodón no-transgénico, dos amplicones de DNA para algodón heterozigo que contiene el evento MON 88913 y un amplicón de DNA para algodón MON 88913 homozigo que es distinto de cualquier otro algodón no MON-88913 Los controles para este análisis deben incluir un control positivo de algodón homozigo y heterozigo que contenga el DNA del evento MON 88913, un control negativo de un algodón no transgénico , y un control negativo que no contiene plantilla de DNA Este ensayo es optimizado para usar con Stratagen Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient termociclador Otros métodos y aparatos conocidos a aquellos habildosos en el arte que produce amplicones que identifican la zigocidad de un progenie de cruces hechos con plantas de algodón MON 88913 esta dentro las posibilidades del arte

Tabla 4 Soluciones de Reacción del Ensayo de Zigocidad

Paso	Reagente	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Adicionar hasta volumen final de 10 µl	—
2	2X Mezcla Maestra Universal (Applied Biosystems cat # 4304437)	5 0 µl	1X concentración final
3	Primers SQ 1099, SQ 1100, SQ 1353 (resuspendidos en agua libre de nucleasa a una concentración de 20 µM)	0.5 µl	0 25 µM concentración final
4	Primer 6FAM™ (resuspendido en agua libre de nucleasa a una concentración de 20 µM)	0.2 µl	0 4 µM concentración final
	Primer VIC™		

5	(resuspendido en agua libre de nucleasa a una concentración de 20 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ M concentración fina
6	Polimerasa de DNA <i>REDTaq</i> (1 unit/ μ l)	10 μ l (recomendado cambiar las pipetas antes del próximo paso)	1 unidad/reacción
8	DNA extraído (plantilla): ▪ Muestras para ser analizadas (Hojas individuales) ▪ Control Negativo ▪ Control Negativo ▪ Control Positivo ▪ Control positivo	30 μ l ○ 4- 80 ng de DNA genómico ○ 4 ng de DNA genómico de algodón no transgénico ○ No plantilla de DNA (solución en la cual DNA fue resuspendido) ○ 4 ng de DNA del evento conocido de algodón heterozigo MON 88913 ○ 4 ng de DNA del evento conocido de algodón homozigo MON 88913 .	Diluido en agua
9	Mezclar suavemente y adicionar 1 –2 gotas de aceite mineral en la		

	parte superior de cada reacción		
--	------------------------------------	--	--

Tabla 5 Condiciones del Termociclador en el ensayo de Zigocidad

[0073] Proceda con la amplificación de DNA en un Stratagen Robocycler, MJ Engine, Perkin –Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient termociclador, usando los siguientes parámetros de ciclado. Cuando el PCR es realizado en el MJ Engine o Eppendorf Mastercycler Gradient, el termociclador debe ser operado en una manera calculada Cuando se realiza en PCR utilizando el termociclador Perkin-Elmer 9700 , opere el termociclador con la velocidad de rampa fijada en el máximo

Ciclo No	Parámetros . Stratagen Robocycler
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 1 minuto 60 °C 1 minutos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

Ciclo No	Parámetros MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 10 segundos 60 °C 30 segundos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

Ciclo No	Parámetros . Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 15 segundos

	60 °C 15 segundos
	72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

EJEMPLO 7

[0074] Análisis de muestras de DNA genómico de algodón fue conducido usando un método de punto final Taqman®. La producción del amplicón de diagnóstico para DNA genómico de MON 88913 fue producida mediante el uso un conjunto de primer A que incluía primers de eventos. SEQ ID NO.21, SEQ ID NO 22 y sonda 6-FAM SEQ ID NO 24, y un conjunto de primer B que incluía primers de eventos. SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, y sonda 6 FAM SEQ ID NO:28. El método usa un formato de 96 o 384 columnas y un Sistema PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o MJ Research DNA Engine PT-225. El DNA extraído de las muestras de tejido de algodón como se describió previamente debe estar en el rango de 5 –10 ng por reacción de PCR. Cada reacción tiene un volumen final de 10 µl consistente de 0.5 µl de concentración igual de los primers de evento (20 µM), 5.0 µl de 2X mezcla maestra universal, 0.2 µl de sonda 6-FAM (10 µM), 3 µl de muestra de DNA (5-10 ng) y agua a 10 µl. Los parámetros de ciclado termal son 1 ciclo 50 °C por 2 minutos, 1 ciclo 95 °C por 10 minutos, 10 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 64 °C por 1 minuto luego - 1°C/ciclo, 30 ciclos 95 °C por 15 segundos, 54 °C por 1 minuto luego mantener a 10 °C. La producción de amplicón fue determinada por un lector de microplato, por ejemplo, un TECAN Safire (Durham, NC) usando las condiciones descritas por el fabricante. Un programa de análisis de datos (TaqPro™) fue usado para calificar la producción de los amplicones marcados. Otro equipo y métodos de análisis conocidos en el arte de la detección de DNA pueden ser usados para detectar amplicones de la presente invención.

[0075] Un depósito de Monsanto Technology LLC de la semilla de algodón MON 88913 expuesta anteriormente y recitada en las reivindicaciones, ha sido hecho bajo el Tratado de Budapest con el American Type Culture Collection (ATCC), 1081 University

Boulevard, Manassas, Va 20110 El número de acceso ATCC es PTA -4854 El depósito será mantenido en el depositario por un período de 30 años, o 5 años después del último requerimiento, o por la vida efectiva de la patente, cualquiera el que sea más largo, y será reemplazado como sea necesario durante el período

[0076] Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debe ser aparente para las personas experimentadas en el arte que la invención puede ser modificada en arreglo y detalles sin apartarse de tales principios. Nosotros reivindicamos todas las modificaciones que están dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones anexas

[0077] Todas las publicaciones y documentos de patentes publicados citados en esta especificación son incorporadas aquí por referencia en la misma extensión como si cada publicación individual o aplicación de patente fuera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia

REIVINDICACIONES

- 1 Semilla del evento de algodón designado MON 88913 y que tiene semillas representativas depositadas con el American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-4854
- 2 La planta de algodón y partes de ella producida por el crecimiento de la semilla de la reivindicación 1
- 3 La planta de algodón y partes de ella de la reivindicación 2, que incluye polen, óvulo, flores, cápsulas, motas, tallos, maíces, u hojas
- 4 Progenie de la planta de algodón de la reivindicación 2 tolerante al Glifosato
- 5 Una planta de algodón progenie de la reivindicación 4, donde el genoma de la mencionada planta de algodón incluye una o mas moléculas de DNA seleccionadas de un grupo consistentes de SEQ ID NO.1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO:4,.
- 6 Una semilla o planta de algodón progenie o partes de ellas de la reivindicación 4, cuyo genoma produce un amplicón que comprende SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO 2, en un método de amplificación de DNA
- 7 Una molécula primer polinucleótido de DNA aislada que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO 3, o sus complementos que es útil en el método de amplificación del DNA para producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO 1 para el evento de algodón MON 88913

8. Una molécula primer polinucleótido de DNA aislada que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO 4, o sus complementos que es útil en el método de amplificación del DNA para producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO.2 para el evento de algodón MON 88913
- 9 Un kit de detección de DNA que comprende al menos una molécula de 11 o mas nucleótido contiguos homólogos o complementarios a SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO 4, que cuando se usan en métodos de amplificación de DNA producen un amplicón de diagnóstico que comprende SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO 2, para el evento de algodón MON 88913
10. Un método de producir un aplanta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato que comprende
 - a Cruzar sexualmente una primera planta parental de algodón tolerante al glifosato de evento MON 88913 y una segunda planta parental de algodón que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, de esta manera produciendo un pluralidad de plantas de primer progenie, y
 - b Seleccionar un planta de primer progenie que es tolerante al glifosato, y
 - c Autofecundar la mencionada planta de primer progenie, de esta manera produciendo una planta de segundo progenie, y
 - d. Seleccionar de esa planta de segundo progenie, una planta tolerante al glifosato
- 11 El método de la reivindicación 10 comprende además el paso de retro cruzar la planta de primer progenie que es tolerante al glifosato o la planta de segundo progenie que es tolerante al glifosato a la segunda planta parental o

una tercera planta parental, así produciendo una planta que tolera la aplicación de glifosato

12 Un método de detectar la presencia de DNA correspondiente al evento de algodón MON 88913 en una muestra, el método comprende

- a. Contactar la muestra que incluye el DNA con un conjunto primer de DNA, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con un DNA genómico de un evento de algodón MON 88913, produce un amplicón de diagnóstico que comprende SE ID NO.1 o SEQ ID NO.2 y
- b Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el amplicón de diagnóstico, y
- c Detectar el amplicón de diagnóstico

13 En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22 y SEQ ID NO 24

14 En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27 y SEQ ID NO 28

15 Un método para detectar la presencia de un DNA correspondiente a un evento de algodón MON 88913 en una muestra, el método comprende

- a Contactar la muestra que incluye el DNA con una sonda que hibridiza bajo condiciones rigurosas de hibridización con DNA genómico del evento de algodón MON 88913y no hibridiza bajo rigurosas condiciones de hibndización con un DNA genómico de una planta de

algodón de control, donde dicha sonda es homóloga o complementaria a SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO 2, y

- b. Someter la muestra y la sonda a rigurosas condiciones de hibridización, y
- c Detectar la hibridización de la sonda al DNA

16 Una planta de algodón que comprende rasgos de tolerancia al glifosato que esta genéticamente ligada a un complemento de un ácido nucleico marcador, donde la mencionada molécula de ácido nucleico marcador es homóloga o complementaria a una molécula de DNA seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO.2.

17 Un método para determinar la zigocidad de un progenie de algodón del evento MON 88913 que comprende

- a Contactar la muestra que comprende el DNA de algodón con un conjunto primer que comprende SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22 y SEQ ID NO 23, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico del evento de algodón MON 88913, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento de algodón MON 88913, y
- b Realizara la reacción de amplificación de ácido nucleico, de esta manera produciendo el primer amplicón, y
- c Detectar el primer amplicón, y
- d Contactar la muestra que incluye el DNA del algodón, con el mencionado conjunto de primer, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que incluye DNA genómico de

algodón nativo homólogo a la región genómica de algodón del transgene de inserción identificado como evento de algodón MON 88913

- e Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el segundo amplicón, y
- f Detectar el segundo amplicón; y
- g. Comparar el primero y segundo amplicón en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterozigo para la inserción transgénica

18. Un método para determinar la zigocidad del progenie del evento de algodón Mon 88913 que incluye

- a Contactar la muestra que incluye el DNA de algodón con un conjunto de primer que comprende SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID, NO 23, SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO.25, y
- b Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, y
- c. Detectar los productos de la reacción

19. Un método para controlar malezas en un cultivo de algodón de evento MON 88913 que comprende el paso de aplicar una dosis efectiva de herbicida que contiene glifosato a dicha siembra de algodón de evento MON 88913

REIVINDICACIONES CORREGIDAS DE ACUERDO AL ARTICULO 19 DEL PCT

Recibidas por el Departamento internacional el 26 de Enero de 2005.

Las reivindicaciones originales 1, 7, 8, 10, 12, 15, y 19 fueron corregidas.

La reivindicación 20 fue añadida.

1. Semilla del evento de algodón designado MON 88913, comprendida dentro de SEQ ID NO: 1 Y SEQ ID NO: 2 y que tiene semillas representativas depositadas con el American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-4854.
2. La planta de algodón y partes de ella producida por el crecimiento de la semilla de la reivindicación 1.
3. La planta de algodón y partes de ella de la reivindicación 2, que incluye polen, óvulo, flores, cápsulas, motas, tallos, maíces, u hojas.
4. Progenie de la planta de algodón de la reivindicación 2 tolerante al Glifosato.
5. Una planta de algodón progenie de la reivindicación 4, donde el genoma de la mencionada planta de algodón incluye una o más moléculas de DNA seleccionadas de un grupo consistentes de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
6. Una semilla o planta de algodón progenie o partes de ellas de la reivindicación 4, cuyo genoma produce un amplicón que comprende SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO:2, en un método de amplificación de DNA.
7. Un set de primers de DNA que consiste de dos moléculas de DNA, donde la primera molécula tiene al menos 11 ó más polinucleótidos continuos en cualquier porción sobre la región transgénica de la molécula de DNA SEQ ID NO: 3 o su complemento; y la segunda molécula de DNA es de un largo similar comprendiendo cualquier porción del flanco 5 de la región genómica del DNA del algodón SEQ ID NO: 3 o su complemento, estas moléculas de DNA cuando se usan simultáneamente sirven como método de amplificación del DNA para

120

producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO: 1 para el evento de algodón MON 88913.

8. Un set primer de DNA que comprende dos moléculas de DNA, donde la primera molécula comprende al menos 11 ó más polinucleótidos continuos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de DNA de SEQ ID NO. 4, o su complemento; y la segunda molécula de DNA de un largo similar que abarque cualquier porción del flanco 3 de la región genómica del DNA del algodón SEQ ID NO: 3 o su complemento, donde estas moléculas de DNA cuando se usan simultáneamente sirven como un set primer de DNA en el método de amplificación del DNA para producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO:2, para el evento de algodón MON 88913.
9. Un kit de detección de DNA que comprende al menos una molécula de 11 o mas nucleótido contiguos homólogos o complementarios a SEQ ID NO:3 ó SEQ ID NO:4, que cuando se usan en métodos de amplificación de DNA producen un amplicón de diagnóstico que comprende SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, para el evento de algodón MON 88913
10. Un método de producir una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato que comprende:
 - a. Cruzar sexualmente una primera planta parental de algodón tolerante al glifosato de evento MON 88913 que comprende SEQ ID NO: 1 y EQ ID NO: 2 y una segunda planta parental de algodón que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, de esta manera produciendo un pluralidad de plantas de primer progenie; y
 - b. Seleccionar un planta de primer progenie que es tolerante al glifosato; y
 - c. Autofecundar la mencionada planta de primer progenie, de esta manera produciendo una planta de segundo progenie; y
 - d. Seleccionar de esa planta de segundo progenie, una planta tolerante al glifosato.

- 11 El método de la reivindicación 10 comprende además el paso de retro cruzar la planta de primer progenie que es tolerante al glifosato o la planta de segundo progenie que es tolerante al glifosato a la segunda planta parental o una tercera planta parental, así produciendo una planta que tolera la aplicación de glifosato.
12. Un método de detectar la presencia de DNA correspondiente al evento de algodón MON 88913 que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2 en una muestra. El método abarca:
- a. Contactar la muestra que incluye el DNA con un conjunto primer de DNA que incorpora:
 - i. Por lo menos 11 nucleótidos continuos de un flanco 5 de la región genómica del DNA de un algodón flanqueando el sitio de inserción en el evento de algodón MON 88913 o su complemento; o un flanco 3 de la región genómica del DNA de un algodón flanqueando el sitio de inserción en el evento de algodón MON 88913 o su complemento; y
 - ii. Por lo menos 11 nucleótidos continuos de la región transgénica de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con un DNA genómico de un evento de algodón MON 88913, produce un amplicón de diagnóstico que comprende SE ID NO:1 o SEQ ID NO:2 y
 - b. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo una muestra del amplicón; y
 - c. Comparar la muestra de aplicón con el amplicón de diagnóstico para determinar si el aplicón de muestra comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
13. En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24.
- 14 En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.

15. Un método para detectar la presencia de un DNA correspondiente a un evento de algodón MON 88913 en una muestra, el método comprende:
 - a. Contactar la muestra que incluye el DNA con una sonda que hibridiza bajo condiciones rigurosas de hibridización con DNA genómico del evento de algodón MON 88913, comprendiendo SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO: 2 y no hibridiza bajo rigurosas condiciones de hibridización con un DNA genómico de una planta de algodón de control, donde dicha sonda es homóloga o complementaria a SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2, y
 - b. Someter la muestra y la sonda a rigurosas condiciones de hibridización; y
 - c. Detectar la hibridización de la sonda al DNA

16. Una planta de algodón que comprende rasgos de tolerancia al glifosato que esta genéticamente ligada a un complemento de un ácido nucleico marcador, donde la mencionada molécula de ácido nucleico marcador es homóloga o complementaria a una molécula de DNA seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

17. Un método para determinar la zigocidad de un progenie de algodón del evento MON 88913 que comprende
 - a. Contactar la muestra que comprende el DNA de algodón con un conjunto primer que comprende SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico del evento de algodón MON 88913, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento de algodón MON 88913; y
 - b. Realizara la reacción de amplificación de ácido nucleico, de esta manera produciendo el primer amplicón; y
 - c. Detectar el primer amplicón; y
 - d. Contactar la muestra que incluye el DNA del algodón, con el mencionado conjunto de primer, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que incluye DNA genómico de algodón nativo homólogo a la región genómica

de algodón del transgene de inserción identificado como evento de algodón MON 88913.

- e. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el segundo amplicón; y
- f. Detectar el segundo amplicón; y
- g. Comparar el primero y segundo amplicón en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterozigo para la inserción transgénica

18. Un método para determinar la zigocidad del progenie del evento de algodón Mon 88913 que incluye:

- a. Contactar la muestra que incluye el DNA de algodón con un conjunto de primer que comprende SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25, y
- b. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico; y
- c. Detectar los productos de la reacción.

19. Un método para controlar malezas en un cultivo de algodón de evento MON 88913 comprendiendo SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2 que comprende el paso de aplicar una dosis efectiva de herbicida que contiene glifosato a dicha siembra de algodón de evento MON 88913.

20. (Nueva) El método de la reivindicación 12, en donde el set primer de DNA involucra al menos una molécula de 11 o más nucleótidos homólogos continuos o complementarios a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

PATENT COOPERATION TREATY

21 MAR 2005

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To.

BOSCH, Henry, A
Monsanto Services International
270-272 Avenue de Tervuren
B-1150 Brussels
BELGIQUE

APR 1 2005

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

17.03.2005

Applicant's or agent's file reference

(#38-21(5318)A/PCT)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No
PCT/US2004/002907

International filing date (day/month/year)
02.02.2004

Priority date (day/month/year)
12.02.2003

Applicant

MONSANTO TECHNOLOGY LLC et al.

cc: HSAW 11899.0239
cc: Dr. Helbing

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4 REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

4/5/05

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Tikka, K

Tel +49 89 2399-7830



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No PCT/US2004/002907	International filing date (day/month/year) 02.02.2004	Priority date (day/month/year) 12.02.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/82, C12Q1/68		
Applicant MONSANTO TECHNOLOGY LLC et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 4 sheets, as follows. ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions) ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions)		
4. This report contains indications relating to the following items ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 03.09.2004	Date of completion of this report 17.03.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx. 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Pilat, D Telephone No. +49 89 2399-8668 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2004/002907

Box No. I Basis of the report

- 1 With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 filed with telefax on 18.02.2005

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
- 4 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/US2004/002907

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7).

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and /or

2 Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/US2004/002907

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

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

Ad Section I: Basis of the opinion

1. Reference is made to the following documents:

- D1: WO 02/44407 A (ROSQUE INGE ; SES EUROP N V (BE); BARNES STEVE (BE); WEYENS GUY (BE)) 6 June 2002 (2002-06-06)
- D2: US-B-6 462 2581 (FINCHER KAREN L ET AL) 8 October 2002 (2002-10-08)
- D3: PLINE WENDY A ET AL: "Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPS levels in the male reproductive tissue" WEED SCIENCE, vol. 50, no. 4, July 2002 (2002-07), pages 438-447, XP002292800 ISSN: 0043-1745
- D4: WO 02/34946 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC ; YE MINWEI (US); RANGWALA TASNEEM S (US)) 2 May 2002 (2002-05-02)
- D5: MICHAEL A. JONES AND CHARLES E. SNIPES: "Tolerance of Transgenic Cotton to Topical Applications of Glyphosate" JOURNAL OF COTTON SCIENCE, vol. 3, 1999, pages 19-26, XP002292746
- D6: WINDELS P ET AL: "DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD A CASE STUDY" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, GENT, BE, vol. 64, no. 5B, 22 September 1999 (1999-09-22), pages 459-462, XP001032975 ISSN: 0368-9697
- D7: WO 02/100163 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC ; HUBER SCOTT A (US); DOHERTY SEAN (US); ROBER) 19 December 2002 (2002-12-19)
- D8: WO 99/46396 A (MONSANTO CO) 16 September 1999 (1999-09-16)
- D9: EP-A-0 899 341 (MYCOGEN CORP) 3 March 1999 (1999-03-03)
- D10 GINGER G. LIGHT ET AL.: "Yield Of Glyphosate-Tolerant Cotton As Affected By Topical Glyphosate Applications On The Texas High Plains And Rolling Plains" JOURNAL OF COTTON SCIENCE, vol. 7, 2003, pages 231-235, XP002292747

2) Amendments (Article 34 PCT)

The amendments introduced in the claims submitted by the applicant appear to be admissible.

Ad Section V :Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii); citations and explanations supporting such statement

2. Novelty (Article 33 (2) PCT)

- 2.1 None of the document cited in the international search report seem to disclose a seed cotton a plant or plant parts as defined in claims 1-6. The same conclusion applies to a DNA primer set as claimed in claims 7-9, to methods of producing a cotton plant comprising sexual crossing a glyphosate tolerant cotton event MON 88913, to the method of detecting a DNA corresponding to said cotton event MON 88913 as claimed in claims 10-15. Similarly a method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 and a method of controlling weeds in a crop of cotton event MON 88913 as claimed in claims 17-19 seem novel.

3. Inventive step (Article 33 (3) PCT)

- 3.1 Document D4 (WO0234946) is considered to represent the most relevant state of the art. It discloses a commercial cotton event (1445) which provides excellent tolerance to glyphosate through the four-leaf stage but not beyond this stage (see present application p.1 3§).

The difference between claim 1 and this document lies in that claim 1 refers to a different cotton event 88913.

The effect associated with this difference is that said cotton event is more tolerant to glyphosate than the current commercial cotton event (see present application p.19 last §)

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to obtain a new cotton event having an increased tolerance to glyphosate.

D5 (Jones et al.) or D4 (WO9946396) or D3 (Pline et al.) state that glyphosate is gametocide. D3 states that CP4 EPSPS in stigma, anther, preanthesis floral bud and flower petals were significantly less than that in the vegetative leaf tissue (see D3 p. 444 col.2 half page and figure 2b). In the light of D3, it becomes apparent that male reproductive organs in glyphosate resistant cotton appears to be only partially resistant to the effects of glyphosate, presumably because of the insufficient

presence of CP4-EPSPS. Thus, the presence of suboptimal quantities of the CP4-EPSPS in these tissues may slow, instead of completely inhibit, pollen maturation (see D3 p.444 col.2 last § and p.446 col.1 last §).

In view of this prior art, the skilled person would have had an incentive to look for an other cotton event, but would not have had a reasonable expectation of success to obtain the cotton event as presently claimed. This solution claimed in claim 1 seems to involve an inventive step. The same conclusion applies for dependent claims or claims referring to said selected cotton event as claimed in claims 2-11,13,14,15,17-19.

Ad section VIII: Certain observations on the international application.

4. Clarity (Article 6 PCT)

- 4.1 From the present description it is unclear whether the deposited MON 88913 is homozygous or heterozygous.
- 4.2 Should the present seed cotton event designated MON 88913 contain a transgenic endosperm and a wild type embryo then the plant or plant parts produced thereof would be undistinguishable from wild type plants or plant parts.
- 4.3 Should the present seed cotton event designated MON 88913 deposited under accession No PTA-4854 be heterozygous, then a pollen or ovule, produced by growing the seed of claim 1 and due to segregation, would possibly be undistinguishable from wild-type cotton pollen or ovule. Claim 3 has to be clarified.
- 4.4 Claim 16 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved which merely amounts to a statement of the underlying problem. At present, it is unclear based on which criteria a glyphosate trait must be considered as genetically linked. Is the same chromosomal location sufficient?
- 4.5 In the European regional phase, the present authority informs that a patent will not be

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/002907

granted if the claimed subject-matter is directed to a specific plant variety or specific plant varieties. However, if the invention concerns plants and animals and if the technical feasibility of the invention is not confined to a particular plant or animal variety, the invention would be patentable (Article 53(b) EPC).

5. Support and Description (Article 6 PCT and Rule 5a PCT).

Claim 16 relates to a cotton plant. However, there is no example throughout the whole application as filed for a cotton plant glyphosate having a glyphosate trait except the specific cotton event MON 88913 and its progeny. In this respect, the claimed subject-matter does not appear to be adequately supported.

-32-

PCT/US2004/002907
Monsanto Technology LLC

11899.0239.00PC00
February 18, 2005

CLAIMS:

1. Seed of cotton event designated MON 88913 comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and having representative seed deposited with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No. PTA-4854.

2. The cotton plant or parts thereof produced by growing the seed of claim 1.

3. The cotton plant or parts thereof of claim 2, comprising pollen, ovule, flowers, bolls, lint, shoots, roots, or leaves.

4. Glyphosate tolerant progeny of the cotton plant of claim 2.

5. A progeny cotton plant of claim 4, wherein the genome of said cotton plant comprises one or more DNA molecules selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4.

6. A progeny cotton plant or seed or parts thereof of claim 4, the genome of which produces an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO:2 in a DNA amplification method.

7. A DNA primer set comprising two DNA molecules, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:3 or its complement, and the second DNA molecule of similar length comprises any portion of a 5' flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:3 or its complement, where these DNA molecules when used together are useful in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 diagnostic for cotton event MON 88913.

8. A DNA primer set comprising two DNA molecules, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:4, or its complement, and the second DNA molecule of similar length comprises any portion of a 3' flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:4, or its complement, where these DNA molecules when used together are useful as a DNA primer set in a DNA amplification method to produce an amplicon comprising SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913.

9. A DNA detection kit comprising at least one molecule of 11 or more contiguous

-33-

nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4, that when used in a DNA amplification methods produces an amplicon comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO:2 diagnostic for cotton event MON 88913.

10. A method of producing a cotton plant that tolerates application of glyphosate herbicide comprising:

(a) sexually crossing a first glyphosate tolerant cotton event MON 88913 parent plant comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and a second parent cotton plant that lacks the tolerance to glyphosate herbicide, thereby

producing a plurality of first progeny plants; and

(b) selecting a first progeny plant that is tolerant to glyphosate; and

(c) selfing said first progeny plant, thereby producing a plurality of second progeny plants; and

(d) selecting from said second progeny plants, a glyphosate tolerant plant.

11. The method of claim 10 further comprising the step of backcrossing the first progeny plant that is tolerant to glyphosate or the second progeny plant that is glyphosate tolerant to the second parent plant or a third parent plant, thereby producing a plant that tolerates the application of glyphosate.

12. A method of detecting the presence of DNA corresponding to cotton event MON 88913 comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 in a sample, the method comprising:

(a) contacting the sample comprising DNA with a DNA primer set comprising

(i) at least 11 contiguous nucleotides of a 5' flanking cotton genomic DNA region flanking the insertion site in cotton event MON88913 or its complement, or a 3' flanking cotton genomic DNA region flanking the insertion site in cotton event MON88913 or its complement, and

(ii) at least 11 contiguous nucleotides of the transgene region of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4;

which when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from the cotton event MON 88913, produces a diagnostic amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2;

and

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing a sample amplicon;

and

(c) comparing the sample amplicon to the diagnostic amplicon to determine whether the sample amplicon comprises SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

13. In the method of claim 12, where in said primer set comprises SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:24.

14. In the method of claim 12, wherein said primer set comprises SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:28.

15. A method of detecting the presence of a DNA corresponding to cotton event MON 88913 in a sample, the method comprising:

(a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from the cotton event MON 88913, comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control cotton

plant genomic DNA, wherein said probe is homologous or complementary to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; and

(b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and

(c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

16. A cotton plant comprising a glyphosate tolerant trait that is genetically linked to a complement of a marker polynucleic acid, wherein said marker polynucleic acid molecule is homologous or complementary to a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

17. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

(a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON 88913, produces a first amplicon that is diagnostic for cotton event MON 88913; and

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the first amplicon; and

(c) detecting the first amplicon; and

(d) contacting the sample comprising cotton DNA with said primer set, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton plants produces a

-35-

second amplicon comprising the native cotton genomic DNA homologous to the cotton genomic region of a transgene insertion identified as cotton event MON 88913;

(e) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the second

amplicon; and

(f) detecting the second amplicon; and

(g) comparing the first and second amplicons in a sample, wherein the presence of both amplicons indicates the sample is heterozygous for the transgene insertion.

18. A method of determining the zygosity of the progeny of cotton event MON 88913 comprising:

(a) contacting the sample comprising cotton DNA with a primer set comprising SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, and SEQ ID NO:25; and

(b) performing a nucleic acid amplification reaction; and

(c) detecting the products of the reaction.

19. A method for controlling weeds in a crop of cotton event MON 88913, comprising SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, comprising the step of applying an effective dose of a glyphosate containing herbicide to said crop of cotton event MON 88913.

SOBRE ESTAS REIVINDICACIONES SE DEBE HACER EL EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE ESTA SOLICITUD.

REIVINDICACIONES CORREGIDAS DEACUERDO AL ARTICULO 34 DEL PCT
Recibidas por el Departamento internacional el 18 de Febrero de 2005.

1. Semilla del evento de algodón designado MON 88913, comprendida dentro de SEQ ID NO: 1 Y SEQ ID NO: 2 y que tiene semillas representativas depositadas con el American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-4854.
2. La planta de algodón y partes de ella producida por el crecimiento de la semilla de la reivindicación 1.
3. La planta de algodón y partes de ella de la reivindicación 2, que incluye polen, óvulo, flores, cápsulas, motas, tallos, maíces, u hojas.
4. Progenie de la planta de algodón de la reivindicación 2 tolerante al Glifosato.
5. Una planta de algodón progenie de la reivindicación 4, donde el genoma de la mencionada planta de algodón incluye una o más moléculas de DNA seleccionadas de un grupo consistentes de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
6. Una semilla o planta de algodón progenie o partes de ellas de la reivindicación 4, cuyo genoma produce un amplicón que comprende SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2, en un método de amplificación de DNA.
7. Un set de primers de DNA que consiste de dos moléculas de DNA, donde la primera molécula tiene al menos 11 ó más polinucleótidos continuos en cualquier porción sobre la región transgénica de la molécula de DNA SEQ ID NO: 3 ó su complemento; y la segunda molécula de DNA es de un largo similar comprendiendo cualquier porción (5 flanking cotton genomic DNA region of SEQ ID NO:3) del

flanco 5 de la región genómica del DNA del algodón SEQ ID NO: 3 o su complemento, estas moléculas de DNA cuando se usan simultáneamente sirven como método de amplificación del DNA para producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO: 1 para el evento de algodón MON 88913.

8. Un set primer de DNA que comprende dos moléculas de DNA, donde la primera molécula comprende al menos 11 o más polinucleótidos continuos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de DNA de SEQ ID NO: 4, ó su complemento; y la segunda molécula de DNA de un largo similar que abarque cualquier porción del flanco 3 de la región genómica del DNA del algodón SEQ ID NO: 3 ó su complemento, donde estas moléculas de DNA cuando se usan simultáneamente sirven como un set primer de DNA en el método de amplificación del DNA para producir un amplicón de diagnóstico que incluye SEQ ID NO:2 para el evento de algodón MON 88913.
9. Un kit de detección de DNA que comprende al menos una molécula de 11 o más nucleótido contiguos homólogos o complementarios a SEQ ID NO:3 ó SEQ ID NO:4, que cuando se usan en métodos de amplificación de DNA producen un amplicón de diagnóstico que comprende SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2, para el evento de algodón MON 88913.
10. Un método de producir una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato que comprende:
 - a. Cruzar sexualmente una primera planta parental de algodón tolerante al glifosato de evento MON 88913 que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y una segunda planta parental de algodón que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, de esta manera produciendo un pluralidad de plantas de primer progenie; y
 - b. Seleccionar una planta de primer progenie que es tolerante al glifosato; y
 - c. Autofecundar la mencionada planta de primer progenie, de esta manera produciendo una planta de segundo progenie; y

- d. Seleccionar de esa planta de segundo progenie, una planta tolerante al glifosato
11. El método de la reivindicación 10 comprende además el paso de retro cruzar la planta de primer progenie que es tolerante al glifosato o la planta de segundo progenie que es tolerante al glifosato a la segunda planta parental o una tercera planta parental, así produciendo una planta que tolera la aplicación de glifosato.
12. Un método de detectar la presencia de DNA correspondiente al evento de algodón MON 88913 que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 en una muestra. El método abarca:
- a. Contactar la muestra que incluye el DNA con un conjunto primer de DNA que incorpora:
 - i. Por lo menos 11 nucleótidos continuos de un flanco 5 de la región genómica del DNA de un algodón flanqueando el sitio de inserción en el evento de algodón MON 88913 o su complemento; o un flanco 3 de la región genómica del DNA de un algodón flanqueando el sitio de inserción en el evento de algodón MON 88913 o su complemento; y
 - ii. Por lo menos 11 nucleótidos continuos de la región transgénica de SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4 que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con un DNA genómico de un evento de algodón MON 88913, producen un amplicón de diagnóstico que comprende SE ID NO:1 ó SEQ ID NO:2; y
 - b. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo una muestra del amplicón; y
 - c. Comparar la muestra de aplicón con el amplicón de diagnóstico para determinar si el aplicón de muestra comprende SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2.
13. En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24.
14. En el método de la reivindicación 12, donde el mencionado conjunto de primer comprende SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO. 28.

15. Un método para detectar la presencia de un DNA correspondiente a un evento de algodón MON 88913 en una muestra, el método comprende:
- Contactar la muestra que incluye el DNA con una sonda que hibridiza bajo condiciones rigurosas de hibridización con DNA genómico del evento de algodón MON 88913, comprendiendo SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y no hibridiza bajo rigurosas condiciones de hibridización con un DNA genómico de una planta de algodón de control, donde dicha sonda es homóloga o complementaria a SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2, y
 - Someter la muestra y la sonda a rigurosas condiciones de hibridización; y
 - Detectar la hibridización de la sonda al DNA.
16. Una planta de algodón que comprende rasgos de tolerancia al glifosato que esta genéticamente ligada a un complemento de un ácido nucleico marcador, donde la mencionada molécula de ácido nucleico marcador es homóloga o complementaria a una molécula de DNA seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.
17. Un método para determinar la zigocidad de una progenie de algodón del evento MON 88913 que comprende
- Contactar la muestra que comprende el DNA de algodón con un conjunto primer que comprende SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico del evento de algodón MON 88913, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento de algodón MON 88913; y
 - Realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico, de esta manera produciendo el primer amplicón; y
 - Detectar el primer amplicón; y
 - Contactar la muestra que incluye el DNA del algodón, con el mencionado conjunto de primer, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con DNA genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que incluye DNA genómico de algodón nativo homólogo a la región

genómica de algodón del transgene de inserción identificado como evento de algodón MON 88913.

- e. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, así produciendo el segundo amplicón, y
- f. Detectar el segundo amplicón; y
- g. Comparar el primero y segundo amplicón en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterozigo para la inserción transgénica.

18. Un método para determinar la zigocidad de la progenie del evento de algodón Mon 88913 que incluye:

- a. Contactar la muestra que incluye el DNA de algodón con un conjunto de primer que comprende SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25, y
- b. Realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico; y
- c. Detectar los productos de la reacción.

19. Un método para controlar malezas en un cultivo de algodón de evento MON 88913 comprendiendo SEQ ID NO.1 y SEQ ID NO: 2 que comprende el paso de aplicar una dosis efectiva de herbicida que contiene glifosato a dicha siembra de algodón de evento MON 88913.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To

HOWREY SIMON ARNOLD & WHITE, LLP
Attn. Kammerer, Patricia A.
750 Bering Drive
Houston, TX 77057-2198
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44 1)

Date of mailing (day/month/year) 26/11/2004	
Applicant's or agent's file reference 11899.0239.00PC00	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No PCT/US2004/002907	International filing date (day/month/year) 02/02/2004
Applicant MONSANTO TECHNOLOGY LLC	

- 1 ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report, however, for more details, see the notes on the accompanying sheet

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No (41-22) 740.14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet

- 2 ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith
- 3 ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40 2, the applicant is notified that
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest, the applicant will be notified as soon as a decision is made

4 Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis 1 and 90bis 3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later), otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Wolfgang-Peter Schießl
---	--

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 25 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged,
- (a) the claim is cancelled,
- (m) the claim is new,
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed,
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

- 1 [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers, claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added."
- 2 [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11"
- 3 [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged, claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added, all other claims unchanged"
- 4 [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged, claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled, claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14, claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17, new claims 20 and 21 added"

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

145

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 11899.0239.00PC00	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No PCT/US2004/002907	International filing date (day/month/year) 02/02/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/02/2003
Applicant MONSANTO TECHNOLOGY LLC		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a ☐ With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2 ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4 With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established by this Authority to read as follows

5 With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6 With regards to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2004/002907

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

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

3 Additional comments

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2004/002907

Box 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 12,15
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
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
- 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 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 an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee
- 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
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 12,15

Present claims 12 and 15 relate to methods defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to method of detecting the presence of NA corresponding to cotton event MON 88913 in a sample, the method comprising contacting a sample comprising DNA with a primer set, which when used in an nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from a cotton event, produces a diagnostic amplicon comprising SEQ ID N°1 or SEQ ID N°2 or a same method comprising contacting the sample comprising a DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from cotton event 88913 and does not hybridize under stringent hybridization conditions with a control cotton plant genomic DNA. The claims cover all methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such method (e.g. method of claims 13,14). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the methods as claimed in claims 13-14.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

149

national Application No

PCT/US2004/002907

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12Q1/68

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)
IPC 7 C12N

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

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

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 02/44407 A (ROSQUE INGE ; SES EUROP N V (BE); BARNES STEVE (BE); WEYENS GUY (BE)) 6 June 2002 (2002-06-06) sequence 10	8
X	US 6 462 258 B1 (FINCHER KAREN L ET AL) 8 October 2002 (2002-10-08) sequence 28	7
Y	PLINE WENDY A ET AL: "Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPS levels in the male reproductive tissue" WEED SCIENCE, vol. 50, no. 4, July 2002 (2002-07), pages 438-447, XP009035327 ISSN: 0043-1745 the whole document	1-11,13, 14,16-19
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 August 2004

Date of mailing of the international search report

26/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Pilat, D

6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/002907

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 02/34946 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC ; YE MINWEI (US); RANGWALA TASNEEM S (US)) 2 May 2002 (2002-05-02) the whole document ✓	1-11,13, 14,16-19
Y	MICHAEL A. JONES AND CHARLES E. SNIPES: "Tolerance of Transgenic Cotton to Topical Applications of Glyphosate" JOURNAL OF COTTON SCIENCE, vol. 3, 1999, pages 19-26, XP002292746 ✓ the whole document	1-11,13, 14,16-19
Y	WINDELS P ET AL: "DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD A CASE STUDY" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, GENT, BE, vol. 64, no. 58, 22 September 1999 (1999-09-22), pages 459-462, XP001032975 ✓ ISSN: 0368-9697 the whole document	13,14, 17,18
A	WO 02/100163 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC ; HUBER SCOTT A (US); DOHERTY SEAN (US); ROBER) 19 December 2002 (2002-12-19) ✓ the whole document	1-11,13, 14,16-19
A	WO 99/46396 A (MONSANTO CO) 16 September 1999 (1999-09-16) page 6, line 6 - line 9 ✓	1-11,13, 14,16-19
A	EP 0 899 341 A (MYCOGEN CORP) 3 March 1999 (1999-03-03) example 12 ✓	
P,A	GINGER G. LIGHT ET AL.: "Yield Of Glyphosate-Tolerant Cotton As Affected By Topical Glyphosate Applications On The Texas High Plains AND Rolling Plains" JOURNAL OF COTTON SCIENCE, vol. 7, 2003, pages 231-235, XP002292747 ✓ the whole document	1-11,13, 14,16-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/US2004/002907

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0244407	A	06-06-2002	AU 1841302 A EP 1337669 A2 WO 0244407 A2	11-06-2002 27-08-2003 06-06-2002
US 6462258	B1	08-10-2002	AU 2088901 A BR 0016460 A CA 2394984 A1 CN 1434868 T EP 1240340 A2 ID 28665 A JP 2003516753 T TR 200201588 T2 WO 0144457 A2 US 2003199681 A1 US 2003199682 A1 US 2002144304 A1	25-06-2001 27-08-2002 21-06-2001 06-08-2003 18-09-2002 21-06-2001 20-05-2003 21-10-2002 21-06-2001 23-10-2003 23-10-2003 03-10-2002
WO 0234946	A	02-05-2002	AU 1536302 A EP 1366070 A2 WO 0234946 A2 US 2002120964 A1 US 2004148666 A1	06-05-2002 03-12-2003 02-05-2002 29-08-2002 29-07-2004
WO 02100163	A	19-12-2002	CN 1463175 T EP 1406482 A2 WO 02100163 A2	24-12-2003 14-04-2004 19-12-2002
WO 9946396	A	16-09-1999	AU 2992999 A BR 9908631 A CN 1300324 T EP 1062354 A2 WO 9946396 A2	27-09-1999 14-11-2000 20-06-2001 27-12-2000 16-09-1999
EP 0899341	A	03-03-1999	EP 0899341 A2 AT 178353 T AU 632038 B2 AU 2926689 A AU 668915 B2 AU 3528493 A AU 708250 B2 AU 6424796 A BR 8806136 A CA 1337406 C CA 1335799 C CN 1034298 A ,B CN 1070309 A ,B CN 1070310 A ,B DE 3856319 D1 DE 3856319 T2 EP 0344302 A1 ES 2016428 A6 GR 88100761 A ,B IL 88266 A IL 104845 A JP 7000065 A JP 8004434 B JP 8022196 B JP 2502253 T	03-03-1999 15-04-1999 17-12-1992 05-07-1989 23-05-1996 20-05-1993 29-07-1999 21-11-1996 15-08-1989 24-10-1995 06-06-1995 02-08-1989 31-03-1993 31-03-1993 06-05-1999 15-07-1999 06-12-1989 01-11-1990 31-03-1994 10-03-1998 16-08-1998 06-01-1995 24-01-1996 06-03-1996 26-07-1990

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/002907

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0899341 A		KR 9710757 B1	30-06-1997
		KR 198008 B1	15-06-1999
		PT 89034 A ,B	30-11-1989
		RU 2225882 C2	20-03-2004
		RU 2128428 C1	10-04-1999
		WO 8905344 A1	15-06-1989
		US 6620990 B1	16-09-2003
		US 6573437 B1	03-06-2003
		US 5856177 A	05-01-1999
		US 6753463 B1	22-06-2004
		US 5834292 A	10-11-1998
		US 5859321 A	12-01-1999
		US 5874662 A	23-02-1999
		US 5695999 A	09-12-1997
		US 6624344 B1	23-09-2003
		US 5583036 A	10-12-1996
		US 6660914 B1	09-12-2003
		US 5244802 A	14-09-1993
		ZA 8808550 A	30-08-1989

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0244407	A	06-06-2002	AU 1841302 A EP 1337669 A2 WO 0244407 A2	11-06-2002 27-08-2003 06-06-2002
US 6462258	B1	08-10-2002	AU 2088901 A BR 0016460 A CA 2394984 A1 CN 1434868 T EP 1240340 A2 ID 28665 A JP 2003516753 T TR 200201588 T2 WO 0144457 A2 US 2003199681 A1 US 2003199682 A1 US 2002144304 A1	25-06-2001 27-08-2002 21-06-2001 06-08-2003 18-09-2002 21-06-2001 20-05-2003 21-10-2002 21-06-2001 23-10-2003 23-10-2003 03-10-2002
WO 0234946	A	02-05-2002	AU 1536302 A EP 1366070 A2 WO 0234946 A2 US 2002120964 A1 US 2004148666 A1	06-05-2002 03-12-2003 02-05-2002 29-08-2002 29-07-2004
WO 02100163	A	19-12-2002	CN 1463175 T EP 1406482 A2 WO 02100163 A2	24-12-2003 14-04-2004 19-12-2002
WO 9946396	A	16-09-1999	AU 2992999 A BR 9908631 A CN 1300324 T EP 1062354 A2 WO 9946396 A2	27-09-1999 14-11-2000 20-06-2001 27-12-2000 16-09-1999
EP 0899341	A	03-03-1999	EP 0899341 A2 AT 178353 T AU 632038 B2 AU 2926689 A AU 668915 B2 AU 3528493 A AU 708250 B2 AU 6424796 A BR 8806136 A CA 1337406 C CA 1335799 C CN 1034298 A ,B CN 1070309 A ,B CN 1070310 A ,B DE 3856319 D1 DE 3856319 T2 EP 0344302 A1 ES 2016428 A6 GR 88100761 A ,B IL 88266 A IL 104845 A JP 7000065 A JP 8004434 B JP 8022196 B JP 2502253 T	03-03-1999 15-04-1999 17-12-1992 05-07-1989 23-05-1996 20-05-1993 29-07-1999 21-11-1996 15-08-1989 24-10-1995 06-06-1995 02-08-1989 31-03-1993 31-03-1993 06-05-1999 15-07-1999 06-12-1989 01-11-1990 31-03-1994 10-03-1998 16-08-1998 06-01-1995 24-01-1996 06-03-1996 26-07-1990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0899341	A	KR 9710757 B1	30-06-1997
		KR 198008 B1	15-06-1999
		PT 89034 A ,B	30-11-1989
		RU 2225882 C2	20-03-2004
		RU 2128428 C1	10-04-1999
		WO 8905344 A1	15-06-1989
		US 6620990 B1	16-09-2003
		US 6573437 B1	03-06-2003
		US 5856177 A	05-01-1999
		US 6753463 B1	22-06-2004
		US 5834292 A	10-11-1998
		US 5859321 A	12-01-1999
		US 5874662 A	23-02-1999
		US 5695999 A	09-12-1997
		US 6624344 B1	23-09-2003
		US 5583036 A	10-12-1996
		US 6660914 B1	09-12-2003
		US 5244802 A	14-09-1993
		ZA 8808550 A	30-08-1989

**TRANSMITTAL LETTER TO THE
UNITED STATES RECEIVING OFFICE**

Date	January 29, 2004
International Application No	
Attorney Docket No	11899 0239 00PC00

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

EV 318619132US
Express Mail mailing number

February 2, 2004
Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Mail Stop PCT, Commission for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22304-1460


Signature of person mailing correspondence

Carina M. Coy
Typed or printed name of person mailing correspondence

II. ☒ New International Application

TITLE	Cotton Event MON 88913 and Compositions and Methods for Detection Thereof
-------	---

Earliest priority date (Day/Month/Year)
12/02/2003

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied (Note check as many boxes as apply)

- A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States
 B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.
 C. ☒ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application (NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority).

application no.	60/447,184	filed on	12 February 2003
application no.		filed on	

- D. ☐ The present international application ☐ is identical to ☐ contains less subject matter than that found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above.
 E. ☒ The present international application ☒ contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C. above. The additional subject matter is found throughout the application and ☒ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed

- A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response
 B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)
 C. ☐ Replacement pages

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

- D. ☐ Submission of Priority Documents

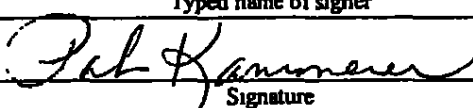
Priority document		Priority document	
-------------------	--	-------------------	--

- E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☒ Other (please specify) postcard, fee calculation sheet

The person signing this form is the.

☐ Applicant	Patricia A. Kammerer
☒ Attorney/Agent (Reg No 29,775)	Typed name of signer
☐ Common Representative	 Signature

PCT REQUEST

The undersigned requests that the present
international application be processed
according to the Patent Cooperation Treaty

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 11899 0239 00PC00

Box No. I TITLE OF INVENTION Cotton Event MON 88913 and Compositions and Methods for Detection Thereof	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) Monsanto Technology LLC 800 N Lindbergh Boulevard St. Louis, Missouri 63167 US	Telephone No Facsimile No Teleprinter No Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) CERNY, R Eric 1141 Richland Drive Chetertfield, Missouri 63017 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as ☒ agent ☐ common representative	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) KAMMERER, Patricia A. HOWREY SIMON ARNOLD & WHITE, LLP 750 Bering Drive Houston, TX 77057-2198 United States of America	Telephone No (713) 787-1400 Facsimile No (713) 787-1440 Teleprinter No Agent's Reg. No. with the Office 29,775
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTORS	
If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) DUONG, Cam 2030 Brown Road St. Louis, Missouri 63114 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg No with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) HART, Jesse L 7382 Pershing Avenue #2W St. Louis, Missouri 63130 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg No with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) HUBER, Scott A 681 Hidden Path Apt. D Creve Coeur, Missouri 63141 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg No with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) KRIEB, Rachel L 282 S 9 th Street Wood River, Illinois 62095 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg No with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTORS	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request</i>	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) LISTELLO, Jennifer J 6 Cherrywood Parc Court O'Fallon, Missouri 63366 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) MARTENS, Amy B 9225 Kit Drive St. Louis, Missouri 63123 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below) SAMMONS, Bernard 380 Lafayette Court Ellisville, Missouri 63011 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below)	This person is ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant Reg. No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	

Box No. V

DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents

However,

☐

DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐

KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection

☐

RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States)

Box No. VI

PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed

Filing Date of earlier application <i>(day/month/year)</i>	Number of earlier application	Where earlier application is		
		national application country or Member of WTO	regional application * regional Office	international application receiving Office
item (1) 12/02/2003	60/447,184	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplement Box

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office)* identified above as

☐ all items

☒ item (1)

☐ item (2)

☐ item (3)

☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii))* ..

BOX No. VII

INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen, the two-letter code may be used)*

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

BOX No. VIII

DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*

☐ Box No. VIII(i)

Declaration as to the identity of the inventor

☐ Box No. VIII(ii)

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent

☐ Box No. VIII(iii)

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application

☐ Box No. VIII(iv)

Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)

☐ Box No. VIII(v)

Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty

Number of
declarations

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

PCT
FEE CALCULATION SHEET
Annex to the Request

For receiving Office use only

Applicant's or agent's file reference 11899 0239 00PC00 Applicant Monsanto Technology LLC	International application No Date stamp of the receiving Office
CALCULATION OF PRESCRIBED FEES 1 TRANSMITTAL FEE \$300.00 T 2 SEARCH FEE \$1,818.00 S International search to be carried out by <u>ISA / EP</u> (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.) 3 INTERNATIONAL FEE Where item (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets } Where item (b) and/or (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets } ☒ i1 first 30 sheets \$1,035.00 i1 ☒ i2 24 x \$11.00 = \$264.00 i2 number of sheets fee per sheet in excess of 30 ☒ i3 additional component (only if sequence listing part of description is filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii) 400 x = \$0.00 i3 Add amounts entered at i1, i2 and i3 and enter total at I \$1,299.00 I (Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of international filing fee.) 4 FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) \$20.00 P 5 TOTAL FEES PAYABLE \$3,437.00 Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box TOTAL	
MODE OF PAYMENT ☒ authorization to charge deposit account (see below) ☐ postal money order ☐ cash ☐ coupons ☐ cheque ☐ bank draft ☐ revenue stamps ☐ other (specify)	
DEPOSIT ACCOUNT AUTHORIZATION (this mode of payment may not be available at all receiving Offices) ☒ Authorization to charge the total fees indicated above. ☒ (This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above ☒ Authorization to charge the fee for priority document.	
Receiving Office RO/US Deposit Account No 01-2508/11899 0239.00PC00 Date February 2, 2004 Name Patricia A. Kammerer Signature 	

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To

KAMMERER, Patricia, A
Howrey Simon Arnold & White, LLP
750 Bering Drive
Houston, TX 77057-2198
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
17 March 2005 (17 03 2005)Applicant's or agent's file reference
11899 0239 00PC00

IMPORTANT NOTICE

International application No
PCT/US2004/002907International filing date (day/month/year)
02 February 2004 (02 02 2004)Priority date (day/month/year)
12 February 2003 (12 02 2003)

Applicant

MONSANTO TECHNOLOGY LLC et al

The International Bureau transmits herewith the following documents

- ☐ copy of the international application as published by the International Bureau on under
No WO
- ☒ copy of international application as republished by the International Bureau on 17 March 2005 (17 03 2005) under
No WO 2004/072235
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document

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

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Facsimile No +41 22 740 14 35

Facsimile No +41 22 338 87 20

Form PCT/IB/311 (January 2004)

DOCKETED
1/24/05

Expediente No			No de Folia
Item		No de unidades	✓
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS X	1.	
Observaciones: Un sobre blanco. que contiene Arte final			

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicacion : 85030337 00000008
 Fecha (AMD): 2005-09-06 17:33:31
 Folios: 165
 Tramite : 011 PC-PATENT 379 IASE MACI 411 PRESEMIAC
 Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 63,061
 FECHA : AGOSTO 22 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36494403	22/08/2005	19,878,780.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

060 12746-841-001-5

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	MODELO DE UTILIDAD ☐	☐
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	☐	☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	☐	☒
- Descripción de la invención.	☐	☒
- Dibujos de ser estos pertinentes.	☐	☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	☐	☐
COMPLETA ☒	INCOMPLETA ☐	☐
DISEÑO INDUSTRIAL ☐		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	☐	☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	☐	☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐
ESQUEMA DE TRAZADO ☐		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	☐	☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	☐	☐
- Representación grafica del esquema de trazado	☐	☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐

()

Fecha:

Folio 407

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a) y/o Representante
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

REFERENCIA:	Radicación No.	05 90937
	Solicitud Internacional	PCT/US2004/002907
	Fecha límite inicio fase Nacional	12 - 09 - 2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	1310
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC

01 NOV. 2005

ALIX CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

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

Sede Centro Carrera 13 No 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador 3 820840 Fax 3 505220
Sede CAN Tr 40A No 38-50 3153265 al 69
Fax 3 505220 Línea 9800-910 165
Web www.sic.gov.co e-mail info@sic.gov.co
Bogotá D C - Colombia