Industria y Co
SUPERINTENI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-121231- -00000-0000
Fecha: 2012-07-18 16:51:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO** METODOS TAQMAN DE PUNTO FINAL PARA DETERMINAR CIGOCIDAD DE MAIZ QUE COMPRENDE EVENTOS TC1507

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

115198-Imprenta Nacional de Colombia-2011

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-121231- -00000-0000
Fecha: 2012-07-18 16:51:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

cación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capítulo I	☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2010/061036	Fecha	2010/12/17
Publicación Internacional No.	WO 2011/075648 A1	Fecha	2011/06/23

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN

MÉTODOS TAQMAN DE PUNTO FINAL PARA DETERMINAR CIGOCIDAD DE MAÍZ QUE COMPRENDE EVENTOS TC1507

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

C07H 021/004, C12P 019/034

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
DOW AGROSCIENCES LLC			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	9330 Zionsville Road,	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	Indianapolis 46268	CORREO ELECTRÓNICO	clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO	Indiana	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. CHEN	Wei	Estadounidense
2. MARCHIONE	Wesley	Estadounidense
3. NOVAK	Stephen	Estadounidense
4. GUPTA	Manju	Estadounidense
5. GREENE	Thomas W.	Estadounidense

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos de América	Indiana	Carmel 46033	13232 Tanzanite Circle,
2. Estados Unidos de América	Indiana	Greenfield 46140	1802 Willowview Court,
3. Estados Unidos de América	Indiana	Westfield 46074	509 Viburnum Run,
4. Estados Unidos de América	Indiana	Carmel	13463 Winamac Court,
5. Estados Unidos de América	Indiana	Zionsville 46077	4668 St. John Circle,

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
De Páez	Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555	

DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A.	US	12/642,352	2009/12/18

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	**No.** 12-0071475	**Fecha:** 2012/07/13
	No. 12-0071425	**Fecha:** 2012/07/13
	No. 12-0067182 } 12-0073241	**Fecha:** 2012/07/04
	No. 12-0057983	**Fecha:** 2012/06/12

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

Nombre del Firmante **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma Luz Clemencia de Páez TP # 23555 CSJ
C.C 35.456.344 de Usaquen	Tarjeta Profesional 23.555

SCT\SDC\ID-AF221765\WPC10975

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 51
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 22
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 6
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poder de **DOW AGROSCIENCES LLC**
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

- ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.
- ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

- ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

- ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
- ☐ Hoja de información complementaria.
- ☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por 12 reivindicaciones adicionales a 10, por valor de $360.000.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4 (71) SOLICITANTE (S)

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. 3. 4.			

5 DATOS DEL SOLICITANTE

PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. 3. 4.			

TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2. 3. 4.			

6 (72) INVENTOR (ES)

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
6. KUMPATLA	**Siva**	**Estadounidense**

7 DATOS INVENTOR (ES)

DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 14524 Baldwin Lane,	**Carmel 46032**	**Indiana**	**Estados Unidos de América**

9 (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.			

5

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 June 2011 (23.06.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/075648 A1

(51) International Patent Classification:
C12P 19/34 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/061036

(22) International Filing Date:
17 December 2010 (17.12.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
12/642,352 18 December 2009 (18.12.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **DOW AGROSCIENCES LLC** [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CHEN, Wei** [CN/US]; 13232 Tanzanite Circle, Carmel, IN 46033 (US). **MARCHIONE, Wesley** [US/US]; 1802 Willowview Court, Greenfield, IN 46140 (US). **NOVAK, Stephen** [US/US]; 509 Viburnum Run, Westfield, IN 46074 (US). **GUPTA, Manju** [US/US]; 13463 Winamac Court, Carmel, IN (US). **GREENE, Thomas, W.** [US/US]; 4668 St. John Circle, Zionsville, IN 46077 (US). **KUMPATLA, Siva** [US/US]; 14524 Baldwin Lane, Carmel, IN 46032 (US).

(74) Agent: **SANDERS, Jay, M.**; Baker & Daniels LLP, 300 North Meridian Street, Suite 2700, Indianapolis, IN 46204 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2011/075648 A1

(54) Title: ENDPOINT TAQMAN METHODS FOR DETERMINING ZYGOSITY OF CORN COMPRISING TC1507 EVENTS

(57) Abstract: A method for zygosity analysis of the maize Cry 1F event TC 1507 is provided. The method provides TC1507 event-specific and maize endogenous reference gene-specific primers and TaqMan probe combinations for use in an endpoint biplex TaqMan PCR assay capable of producing robust genotype calls for assisting in molecular breeding of TC1507.

MÉTODOS TAQMAN DE PUNTO FINAL PARA DETERMINAR CIGOCIDAD DE MAÍZ QUE COMPRENDE EVENTOS TC1507

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Herculex® I es un producto de maíz comercial, que comprende el evento de Cry1F TC1507, que es resistente al daño ocasionado por insectos (especialmente por el barrenador europeo del maíz. El evento en sí ha sido descripto, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.605.310 y 7.449.564.

Se pueden utilizar diversos métodos para detectar la presencia de este evento en una muestra de maíz. Un ejemplo es la técnica de Pirosecuenciación descripta por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18–24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que se superpone al ADN genómico adyacente y el empalme del inserto de ADN. El oligonucleótido se hibrida un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y es incubado en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Las DNTP son agregadas individualmente y la incorporación da lugar a una señal luminosa que se mide. La señal luminosa indica la presencia de un inserto de transgén/secuencia flanqueante debido a la amplificación satisfactoria, hibridación y extensión de una o más bases. (Esta técnica se utiliza habitualmente para la secuenciación inicial, no para la detección de un gen específico cuando se lo conoce).

La Polarización de Fluorescencia es otro método que se puede emplear para detectar un amplicón. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido de manera que se superponga a la región genómica flanqueante y el empalme del inserto de ADN. El oligonucleótido se hibrida a un producto de PCR

monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se lo incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base da lugar a la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como cambio de polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio de la polarización indica la presencia del inserto de transgén/secuencia flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión de base única favorables.

TAQMAN (Life Technologies, Foster City, Calif.) es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. En pocas palabras, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET con un oligo dentro del transgén y uno en la secuencia genómica flanqueante para la detección de eventos específicos. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. La hibridación de la sonda FRET da lugar a la escisión y liberación del resto fluorescente del resto supresor de la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto de transgén debido a la amplificación e hibridación satisfactorias.

Se han descripto balizas moleculares para usar en la detección de secuencias. En pocas palabras, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se superpone al empalme del ADN genómico flanqueante e insertado. La singular estructura de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene a los restos fluorescentes y supresores en estrecha proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de

una polimerasa termoestable y dNTPs. Después de la amplificación favorable por PCR, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia objetivo da lugar a la remoción de la estructura secundaria de la sonda y a la separación espacial de los restos fluorescentes y supresores. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserto del transgén debido a la amplificación e hibridación favorables.

Otro desafío, entre muchos, consiste en hallar un gen de referencia adecuado para una prueba dada. Por ejemplo, como e señala en el resumen de Czechowski *et al.*, "Un conjunto de datos excepcionalmente abundante de estudios con el GeneChip de genoma completo ATH1 de Affymetrix otorgó los medios para identificar una nueva generación de genes de referencia con niveles de expresión muy estables en la especie patrón de plantas de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). Se encontraron cientos de genes de Arabidopsis que rinden mejor que los genes de referencia tradicionales en términos de estabilidad de expresión durante todo el desarrollo y en un rango de condiciones ambientales." (Czechowski *et al.* (2005) Genome–wide identification and testing of superior genes de referencia for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**, 5–17.)

Brodmann *et al.* (2002) se relaciona con la detección por PCR cuantitativa en tiempo real del contenido de maíz transgénico en alimentos correspondiente a cuatro variedades diferentes de maíz aprobadas por la Unión Europea. Brodmann, P.D., P.D., Ilg E.C., Berthoud H., y Herrmann, A. Real–Time Quantitative Polymerase Chain Reactionlos métodos for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *J. of AOAC international* 2002 85 (3)

Hernandez *et al.* (2004) menciona cuatro genes posibles para usar con la PCR en tiempo real. Hernandez, M., Duplan, M.–N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M. y Bertheau, Y. Development and comparison of four real–time polymerase chain reation systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4632–4637.

Costa *et al.* (2007) examinaron estos cuatro genes (también en el contexto de PCR en tiempo real) y concluyeron que los genes de alcohol deshidrogenasa y zeína eran los mejores genes de referencia para detectar un "evento" en una muestra (un gen de lectina) en el caso de problemas de entremezclado de alimentos transgénicos. Costa, L. D. y Martinelli L. Development of a Real–Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining an Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Componentes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1264–1273.

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

Gasparic *et al.* (2008) sugieren la tecnología LNA, partiendo de una comparación con la tecnología de sondas de ciclado, TaqMan y diversas qu´miicas de PCR en tiempo real, para analizar cuantitativamente los eventos del maíz (tales como MON810). Gašparič, Cankar, Žel y Gruden, "Comparison of different real–time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms," BMC Biotechnol. 2008; 8: 26.

US 20070148646 se relaciona con un método de prolongación de cebadores para la cuantificación que requiere la dispensación controlada de nucleótidos individuales que pueden ser detectados y cuantificados por la cantidad de nucleótidos incorporados. Esto se diferencia del método de PCR TaqMan qye utiliza un gen de referencia interno.

Para distinguir entre los genotipos homocigoto y hemicigoto de TC1507, se ha utilizado para este evento un ensayo de invasión. Gupta, M., Nirunsuksiri, W., Schulenberg, G., Hartl, T., Novak, S., Bryan, J., Vanopdorp, N., Bing, J. y Thompson, S. A non–PCR–based Invader Assay Quantitatively Detects Single–Copy Genes in Complex Plant Genomes. Mol. Breeding 2008, 21, 173–181.

Huabang (2009) se relaciona con el análisis basado en PCR del maíz transgénico. Sin embargo, no parece utilizarse ningún gen de referencia. Huabang, "An Accurate and Rapid PCR–Based Zygosity Testing Method for Genetically Modified Maize," Molecular Plant Breeding, 2009, Vol.7, No.3, 619–623.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona, en parte, con un ensayo molecular para determinar la cigosidad del evento TC1507 en el maíz. Más específicamente, la presente invención se relaciona, en parte, con un ensayo de PCr de punto final TaqMan para detectar un evento de Herculex® I TC1507 en el maíz utilizando un gen de referencia endógeno de maíz. Algunas realizaciones se relacionan con ensayos con capacidad de análisis de cigosidad de gran rendimiento. La presente invención se relaciona, además, en forma parcial, con el hallazgo de un gen de referencia preferido para usar en la determinación de la cigosidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra un ejemplo de gráfico de distribución entre los números de muestras y las relaciones absolutas de SOB1/SOB2.

La figura 2 es una representación de la amplificación por PCR en tiempo real de la combinación biplex de TC1507 con diferentes genes de referencia investigados. Se exponen las representaciones de amplificación de PCR en tiempo real correspondientes al biplex de TC1507 con *ivr* (2a), *hmg* (2b), *ivr104*(2c) y *zeína* (2d) con diluciones en serie al doble de ADN genómico de homocigotos Cry1F, respectivamente. Los valores Ct con cada dilución están consignados dentro de sus correspondientes representaciones.

La figura 3 ilustra gráficos de distribución de determinaciones de cigosidad de *Cry1F* con TaqMan de punto final utilizando genes de referencia. Los paneles son los siguientes, en el caso de los ensayos que utilizan: *ivr104* (a), *ivr* (b), *hmg* (c) y *zeína* (d) como genes de referencia. Al completarse la PCR y las lecturas de fluorescencia, se generaron gráficos de distribución: SOB1 = Señal sobre el fondo de FAM (señal de muestra sobre el promedio de la señal de fondo a 535 nm), SOB2 = Señal sobre fondo de Cy5 (señal muestra sobre el promedio de la señal de fondo a 670 nm). En el caso de *ivr104* (a), se pueden efectuar búsquedas de genotipo con SOB1/SOB2 < 0,5 en el caso del tipo salvaje, 0,5< SOB1/SOB2< 2 en el caso de los hemicigotos y SOB1/SOB2 > 2 en el caso de los homocigotos.

La figura 4 ilustra la validación de la determinación de cigosidad de *Cry1F* con el ensayo TaqMan de punto final empleando *ivr104* como gen de referencia en tres poblaciones (dos placas de 96 pocillos de ADN genómico por cada población). Al completarse la PCR y las lecturas de fluorescencia, se generó un gráfico de distribución: SOB1 = Señal sobre el fondo of FAM (relación de la señal de muestra

sobre el promedio de la señal de fondo a 535 nm), SOB2 = Señal sobre fondo de Cy5 (relación de la señal de muestra sobre el promedio de la señal de fondo a 670 nm). Se realizaron búsquedas de genotipos de acuerdo con cúmulos diferenciados de homocigotas, hemicigotas y tipos salvajes. La figura 4a es un gráfico de distribución de la determinación de la cigosidad de *Cry1F* con el ensayo TaqMan de punto final en una población apilada de *Cry34/35 PoCry1F*. La figura 4b es un gráfico de distribución de la determinación de la cigosidad de *Cry1F* con el ensayo TaqMan de punto final en una población de pila simple de *PoCry1F*. La figura 4c (PoCry1F_NK603) sólo tuvo dos cúmulos (homocigotas y hemicigotas) puesto que las plantas WT (de tipo salvaje), como era de esperar, no sobrevivieron a la fumigación con herbicida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 es una secuencia de la secuencia flanqueante 5' del evento de maíz TC1507.

SEC ID NO: 2 es una secuencia de la secuencia flanqueante 3' del evento de maíz TC1507.

SEC ID NO: 3 es una secuencia contigua correspondiente al evento de maíz TC1507 que incluye una secuencia flanqueante 5', el inserto cry1F y una secuencia flanqueante 3'.

SEC ID NOs: 4 – 21 son cebadores y sondas ilustrativos para usar de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona, en parte, con un ensayo TaqMan de punto final basado en fluorescencia que utiliza un gen endógeno como control de referencia (número de copias) para el análisis de cigosidad de alto rendimiento de

TC1507, un evento Cry1F del maíz. La presente invención se relaciona, además, en parte, con el descubrimiento de un gen de referencia preferido, el de *invertasa.* Se identificaron varios genes de referencia como opciones posibles.

La presente invención también se relaciona, en parte, con el desarrollo de una PCR Taqman biplex de punto final para el análisis ce cigosidad específico para el evento TC1507. Además, la presente invención se relaciona, en parte, con el desarrollo de kits de ensayo de reproducción de TC1507.

Los ensayos TaqMan de Punto final se basan en una estrategia de más/menos, en la cual "más" significa que la muestra es positiva respecto del gen analizado y un "menos" significa que la muestra es negativa respecto del gen analizado. Estos ensayos utilizan, por lo general, dos series de oligonucleótidos para la identificación de la secuencia del transgén TC1507 y la secuencia del gen de tipo salvaje, respectivamente, como así también las sondas con doble marca para medir el contenido de las secuencias del transgén y el tipo salvaje.

Si bien el ensayo Invader ha sido una técnica robusta para caracterizar estos eventos, es muy sensible a la calidad del ADN. Además, el ensayo requiere una elevada cantidad de ADN. El ensayo Invader requiere asimismo un paso adicional de desnaturalización que, si no se maneja correctamente, puede causar el fracaso del ensayo Invadeer. Por añadidura, el tiempo más prolongado del ensayo Invader lo limita en su flexibilidad para hacer frente con eficacia a grandes números de muestras de TC1507 para el análisis en un entorno comercial. Una de las principales ventajas de la presente invención es el ahorro de tiempo y la eliminación del paso de desnaturalización.

El presente análisis TaqMan de Punto Final para detectar eventos TC1507 ofrece asombrosas ventajas con respecto a Invader, especialmente al analizar

grandes números de muestras. Sin embargo, su aplicación a TC1507 fue complicada. Por un lado, la región de borde de TC1507 no es una verdadera secuencia genómica. Por ejemplo, con tiene secuencias flanqueantes repetitivas. Es una secuencia única que contiene fragmentos del transgén y retrotransposones, que habrían sido vistos como obstáculo muy significativo para la implementación de la estrategia más/menos del ensayo TaqMan de punto final en este contexto.

Además, por ejemplo, se intentaron múltiples combinaciones de cebadores y sondas. Sin embargo, ninguna de estas combinaciones dio lugar a una señal robusta con capacidad para discriminar entre el alelo de tipo salvaje y el transgén.

En una realización, la reacción de PCR específica para el evento TC1507 amplifica un fragmento de 58 pb, característico del evento, como resultado de la inserción del cassette del constructo TC1507 en el ADN genómico del maíz. Una sonda oligonucleotídica específica del objetivo TC1507 se une al objetivo entre dos cebadores de PCR específicos para el evento y se la marca con una tintura fluorescente y un desactivador. Los marcadores fluorescentes posibles incluyen FAM como tintura reportera en el extremo 5' de la sonda TC1507 y un desactivador Black Hole Quencher 1 (BHQ1) como desactivador en el extremo 3' de la sonda TC1507.

Usando un rango de factores empíricos junto con nuestro criterio, identificamos de manera empírica los genes endógenos del maíz, con capacidad para la amplificación de PCR de una sola o un bajo número de copias, sonda que se puede conservar en numerosos cultivares. Muchísimos genes de referencia eran posibles. Los que seleccionamos para la evaluación inicial fueron evaluados como posibles genes de referencia para el análisis de cigosidad de TC1507. Se

eligieron cinco series de oligos (Tabla 1): *ivr*, ivr104 (fragmentos de 79 y 104 pb de la *invertasa*), *adh* (fragmento de 136 pb de adh1), *hmg* (fragmento de 79bp de *hmga*), y *zeína* (fragmento de 72 pb de zeína). Se evaluaron cebadores específicos para el gen y una sonda específica para el gen, en una realización marcados con Cy5 en el extremo 5' de la sonda y un Black Hole Quencher 2 (BHQ2) en el extremo 3' de la sonda, para usar en la cuantificación rápida para los genes endógenos del maíz evaluados como genes de referencia posibles para el análisis de cigosidad de TC1507.

Los cebadores y sondas de genes específicos para el gen Cry1F y los genes endógenos del maíz fueron analizados para detectar las eficiencias de PCR. También se aprovecharon las combinaciones de cebadores y sondas de los genes endógenos del maíz que habían demostrado tener eficiencias de PCR relativamente similares a la de los cebadores y sondas específicos del evento Cry1F para la capacidad de multiplexdo y el ensayo de cigosidad TaqMan de punto final.

Se analizaron todos los oligos para determinar la eficiencia de PCR. Los oligos con eficiencias de PCR relativamente aproximadas a los oligos específicos del evento fueron aprovechados además para el multiplexado y el ensayo de cigosidad TaqMan de punto final.

En algunas realizaciones, este análisis de cigosidad utiliza un biplex de oligonucleótidos específicos del evento TC1507 y para el evento del gen de referencia endógeno del maíz (*invertasa* en algunas realizaciones preferidas) en el mismo ensayo de amplificación. La cigosidad se determina por la intensidad relativa de la fluorescencia específica del Evento TC1507 en comparación con el ADN de referencia.

En algunas realizaciones, el ensayo específico del evento TC1507 amplifica un fragmento de 58 pb, característico del evento, que es el resultado de la inserción del cassette del constructo TC1507 en el ADN genómico del maíz. Una sonda oligonucleotídica de objetivo específico se une al objetivo entre dos cebadores de PCR específicos del evento TC1507 PCR y se la marca con dos tinturas fluorescentes: FAM como tintura reportera en su extremo 5' y BHQ como tintura desactivadora en su extremo 3'. Se miden los productos de PCR tras el número óptimo de ciclos, cuando la reacción se encuentra en la fase exponencial temprana.

En algunas realizaciones, el sistema específico del maíz amplifica un fragmento de 104 pb del gen de invertasa. Se utiliza un par de oligos específicos de la invertasa y una sonda específica para el gen de invertasa marcada con Cy5 en el extremo 3' y una BHQ en el extremo 5' para la cuantificación rápida.

En algunas realizaciones, el ensayo TaqMan de punto final basado en fluorescencia para el análisis de cigosidad de TC1507 permite la lectura directa de los resultados en un lector de placas para la identificación del Evento Herculex® I TC1507 en el maíz y el gen de referencia.

La presente invención incluye aplicaciones de reproducción asexual tales como el análisis de la introgresión de Herculex® I en otras líneas de maíz.

Se pueden utilizar los métodos de detección y kits de la presente invención para identificar eventos de acuerdo con la presente invención. Los métodos y kits de la presente invención se pueden utilizar para estrategias de reproducción acelerada y para establecer datos de vinculación. Las técnicas de detección de la presente invención son especialmente útiles en combinación con la reproducción de plantas, para determinar qué plantas de la progenie comprenden un evento

dado, una vez cruzada una planta parental que comprende un evento de interés con otra línea vegetal, en un esfuerzo por impartir uno o más rasgos adicionales de interés en la progenie. Estos métodos de análisis de PCR Taqman constituyen una ventaja para los programas de reproducción del maíz, como así también para el control de calidad, especialmente para las semillas de maíz transgénico comercializadas. Ahora también se pueden preparar y utilizar kits de detección de PCR Taqman para estas líneas transgénicas de maíz. Esto también puede mejorar el registro de productos y la administración del producto.

Más aun, la presente invención se puede utilizar para estudiar y caracterizar procesos de integración del transgén, las características del sitio de integración genómica, la clasificación de eventos, la estabilidad de los transgenes y sus secuencias flanqueantes y la expresión génica (especialmente en lo que respecta al silenciamiento de genes, a patrones de metilación de transgenes, efectos de la posición y elementos potenciales relacionados con la expresión tales como MARS [regiones de unión a la matriz] y demás).

Esta invención incluye además procesos para realizar cruzas utilizando una planta TC1507 como por lo menos uno de las progenitoras. Por ejemplo, la presente invención incluye una planta híbrida F_1 que tiene, como una o ambas progenitoras, a cualquiera de las plantas aquí ejemplificadas. Esta invención incluye un método para producir una semilla híbrida F_1 cruzando una planta ejemplificada con una planta diferente (*por ej.* una progenitora endogámica), cosechando la semilla híbrida así obtenida y analizando la muestra de semillas / planta de acuerdo con la presente invención. Se pueden mejorar las características de las plantas así obtenidas mediante un meticuloso estudio de las plantas progenitoras.

Se puede reproducir una planta de maíz resistente a los insectos cruzando sexualmente, en primer lugar, primera una planta progenitora de maíz que consiste en una planta de maíz cultivada a partir de una semilla de cualquiera de las líneas mencionadas en este documento y una segunda planta de maíz progenitora, para producir así una pluralidad de plantas de la primera generación de la progenie, y luego seleccionando una planta de la primera generación que sea resistente a los insectos (o que posea por lo menos uno de los eventos de la presente invención) y autofertilizando la primera planta de la progenie para producir así una pluralidad de plantas de la segunda generación y luego seleccionando de las plantas de la segunda generación una planta que sea resistente a los insectos (o que posea por lo menos uno de los eventos de la presente invención). Estos pasos pueden incluir además la retrocruza de la planta de la primera generación o la planta de la segunda generación con una tercera planta de maíz progenitora. A continuación se puede plantar un cultivo de maíz que comprende las semillas de maíz de la presente invención, o la progenie de las mismas.

Se ha de entender asimismo que también se pueden aparear dos plantas transgénicas diferentes para producir retoños que contengan dos genes exógenos agregados de segregación independiente. La autofertilización de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas respecto de ambos genes exógenos agregados. La retrocruza con una planta progenitora y la cruza externa con una planta no transgénica también están contempladas, al igual que la propagación vegetativa. Otros métodos de reproducción asexual utilizados comúnmente para diferentes rasgos y cultivos son conocidos en la técnica.. Se ha utilizado la retrocruza para transferir genes para un rasgo simplemente heredado y

altamente heredable en un cultivar o línea endogámica homocigota, que es la progenitora recurrente. El origen del rasgo a transferir se denomina progenitor donante. Se espera que el rasgo conveniente se haya transferido a la planta así obtenida de la progenitora donante. Se espera que la planta así obtenida ha de tener los atributos de la progenitora recurrente (*por ej.*, cultivar) y que se haya transferido el rasgo ventajoso de la progenitora donante. Después de la cruza inicial, se seleccionan los individuos que poseen el fenotipo de la progenitora donante y se los cruza repetidamente (retrocruza) con la progenitora recurrente. Se estima que la progenitora obtenida ha de tener los atributos de la progenitora recurrente (*por ej.*, el cultivar) y que se haya transferido el rasgo ventajoso de la progenitora donante.

Se pueden utilizar las moléculas de ADN de la presente invención como marcadores moleculares en el método de reproducción asistida por marcadores (MAB). Las moléculas de ADN de la presente invención se pueden utilizar en métodos (tales como los de marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNPs y SSRs) que identifican los rasgos de utilidad agronómica genéticamente ligados, como se sabe en la técnica. Se puede rastrear el rasgo de resistencia a los insectos en la progenie de una cruza con una planta de maíz de la presente invención (o la progenie de la misma y cualquier otro cultivar o variedad de maíz) utilizando los métodos de MAB. Las moléculas de ADN son marcadores para este rasgo y se pueden emplear métodos MAB muy conocidos en la técnica para rastrear el o los rasgos de resistencia a los insectos en plantas de maíz, donde por lo menos una línea de maíz de la presente invención, o la progenie de la misma, ha servido como progenitora o antecesora. Los métodos de

la presente invención se pueden utilizar para identificar cualquier variedad de maíz con el evento de resistencia a los insectos de la línea de maíz TC1507.

Los métodos de la presente invención incluyen un método para la producción de una planta de maíz resistente a los insectos, donde dicho método comprende la reproducción asexual con una planta de la presente invención. Más específicamente, dichos métodos pueden comprender la cruza de dos plantas de la presente invención, o una planta de la presente invención y cualquier otra planta, y rastrear el evento en cuestión de acuerdo con la presente invención. Los métodos preferidos comprenden además la selección de la progenie de dicha cruza mediante el análisis de dicha progenie para la detección de un evento detectable de acuerdo con la presente invención.

Una planta preferida, o una semilla, propagada y desarrollada de acuerdo con la presente invención comprende, en su genoma, por lo menos una de las secuencias insertadas identificadas en la **Tabla 1**, junto con al menos 20–500 o más nucleótidos contiguos flanqueantes a ambos lados del inserto, como se identifica en la **Tabla 1**. A menos que se indique lo contrario, "evento TC1507" o referencia similar, se refiere al ADN de la SEC ID NO: 3 que incluye el ADN heterólogo insertado en el sitio genómico identificado por la totalidad o parte de ambas secuencias genómicas flanqueantes de SEC ID NOs: 1 y/o SEC ID NO: 2 inmediatamente adyacentes al ADN insertado que sería lógico esperar que se transfiera a la progenie que recibe el ADN insertado como resultado de una cruza sexual de una línea parental que incluye el evento.

En este documento se presentan definiciones y ejemplos para contribuir a describir la presente invención y para guiar a las personas con capacitación normal en la técnica en la puesta en práctica de la invención. A menos que se

indique lo contrario, los términos se han de interpretar de acuerdo con el uso convencional que le asignan las personas con capacitación normal en la técnica pertinente. Se utiliza la nomenclatura de las bases de ADN expuesta en 37 CFR §1.822.

Un "evento" transgénico se produce por la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas producidas como resultado de la inserción del transgén en el genoma de la planta y la selección de una planta determinada en un sitio específico del genoma. El término "evento" se refiere a la transformante original y a la progenie de la transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" se refiere asimismo a una progenie producida por una cruza sexual externa entre la transformante y otra variedad que incluye el ADN genómico/transgén. Aun después de repetidas retrocruzas con una progenitora recurrente, el ADN del transgén insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/transgén) de la progenitora transformada está presente en la progenie de la cruza en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" se refiere asimismo al ADN de la transformante original y la progenie de la misma que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera se transfiera a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de una cruza sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (*por ej.*, la transformante original y la progenie que resulta de la autofertilización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Una "secuencia de empalme" abarca el punto en el cual el ADN insertado en el genoma está ligado al ADN del genoma nativo del maíz que flanquea el punto de inserción, donde la identificación o detección de una u otra secuencia de empalme en el material genético de una planta es suficiente para diagnosticar el evento. Se incluyen las secuencias de ADN que cubren las inserciones en los eventos del maíz aquí descriptos y tramos similares del ADN flanqueante. En este documento se presentan ejemplos específicos de dichas secuencias de diagnóstico; sin embargo, otras secuencias que se superponen a los empalmes de la inserciones, o los empalmes de las inserciones y la secuencia genómica, también son diagnósticas y se las podría utilizar de acuerdo con la presente invención.

Se pueden diseñar cebadores, amplicones y sondas para usar de acuerdo con la presente invención, basándose, en parte, en las secuencias flanqueantes, de empalme y/o insertadas. Se pueden incluir cebadores y amplicones como componentes de la invención. Se pueden emplear métodos de análisis por PCR utilizando amplicones que abarcan el ADN insertado y sus bordes para detectar o identificar variedades de maíz transgénico comercializadas o líneas derivadas de las líneas de maíz transgénico de registradas.

La secuencia de la secuencia flanqueante 5' correspondiente a HERCULEX I (evento TC1507) se presenta como SEC ID NO: 1. La secuencia de la secuencia flanqueante 3' está provista en SEC ID NO: 2. La secuencia del inserto cry1F (junto con las secuencias regulatorias), flanqueadas por las secuencias flanqueantes (de SEC ID NOs: 1 y 2) se presenta bajo el título SEC ID NO: 3. La Tabla 1 presenta las coordenadas de las secuencias de inserto y flanqueantes con respecto a SEC ID NO: 3.

Tabla 1.			
	Ubicación de los residuos en SEC ID NO: 3:		
Evento	**Flanqueante 5'**	**Inserto cry1F**	**Flanqueante 3'**
TC1507	1–2829	2830–9015	9016–11361
	(*ver* SEC ID NO: 1)		(*ver* SEC ID NO: 2)

Estos eventos de inserción, y otros componentes de los mismos, han sido descriptos con más detalle, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.605.310 y 7.449.564 (ver *por ej.* La figura 1 de la patente '564). Sobre la base de estas secuencias de inserto y de borde, se generaron cebadores para eventos específicos, como puede hacerse. El análisis de PCR demostró que estas líneas de maíz pueden ser identificadas en diferentes genotipos de maíz mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estas series de cebadores específicos para el evento. Por consiguiente, se pueden utilizar estos y otros procedimientos relacionados para identificar de manera inequívoca estas líneas de maíz.

En el presente contexto, una "línea" es un grupo de plantas que exhiben poca o ninguna variación genética entre individuos con respecto a por lo menos un rasgo. Dichas líneas pueden ser generadas por varias generaciones de autopolinización y selección, o mediante la propagación vegetativa a partir de una sola progenitora empleando técnicas de cultivo tisular o celular.

En el presente contexto, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos y se refieren a una línea que se utiliza para la producción comercial. "Estabilidad" o "estable" significa que, con respecto a un componente dado, el componente se

mantiene de generación en generación y, preferentemente por lo menos tres generaciones sustancialmente en el mismo nivel, *por ej.*, preferentemente ±15%, más preferentemente ±10%, muy preferentemente ±5%. La estabilidad puede resultar afectada por la temperatura, ubicación, estrés y el momento de la plantación. La comparación de las generaciones subsiguientes en condiciones de campo ha de producir el componente de manera similar.

La "Utilidad Comercial" se define por una planta con buen vigor y alta fertilidad, de tal manera que el cultivo pueda ser producido por los agricultores utilizando el equipamiento agrícola convencional y que se pueda extraer el aceite con los componentes descriptos de la semilla empleando el equipamiento convencional de trituración y extracción. Para ser de utilidad comercial el rendimiento, medido por el peso de las semillas, el contenido de aceite y el total de aceite producido por acre está dentro del 15% del rendimiento promedio de una variedad de canola de otro modo comparable sin los rasgos de valor especial cultivada en la misma región.

"De elite agronómica" se refiere a que la línea tiene características agronómicas convenientes tales como rendimiento, madurez, resistencia a las enfermedades y demás, además de la resistencia a los insectos debido al presente evento (o eventos).

Como ha de apreciar una persona con capacitación en la técnica a la luz de esta descripción, las realizaciones preferidas de kits de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y/o cebadores dirigidos a "secuencias de empalme" o "secuencias de transición" (donde la secuencia flanqueante genómica del maíz se encuentra con la secuencia insertada) o las comprenden. Por ejemplo, esto incluye una sonda, cebador o amplicón polinucleotídico que comprende una

secuencia que incluye los residuos indicados en la Tabla 1. Algunos cebadores preferidos pueden incluir por lo menos ~15 residuos de la secuencia flanqueante adyacente y por lo menos ~15 residuos de la secuencia de inserto adyacente. Se pueden tomar como objetivo los residuos dentro de las 200 bases aproximadamente de las secuencias de empalme. Con esta disposición, se puede utilizar otro cebador en la región flanqueante o inserto para generar un amplicón detectable que indique la presencia de un evento de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, un cebador se une en la región flanqueante y uno se une en el inserto, y se pueden utilizar esos cebadores para generar un amplicón que abarca (e incluye) una secuencia de empalme (residuos 2829–2030 y/o 9015–9016) como se indicara anteriormente. Las SEC ID NOs: 1 y/o 2 pueden estar alineadas con SEC ID NO: 3 para ilustrar esos empalmes.

Una persona con capacitación en la técnica también ha de reconocer que se pueden diseñar cebadores y sondas para hibridarse, en condiciones de hibridación standard y/o condiciones de PCR, a un segmento de SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3 y complementos de las mismas, donde el cebador o la sonda no es perfectamente complementaria de la secuencia ejemplificada. Es decir que se puede tolerar cierto grado de mal apareamiento. En el caso de un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, por ejemplo, por lo general no es necesario que uno o dos nucleótidos aproximadamente se unan a la cadena opuesta si la base mal apareada es interna o está al final del cebador opuesto al amplicón. Más adelante se presentan diversas condiciones de hibridación apropiadas. También se pueden utilizar en las sondas análogos nucleotídicos sintéticos tales como inosina. Se pueden emplear asimismo sondas de péptido ácido nucleico (PNA) tales como sondas de ADN o ARN. Lo importante es que

dichas sondas y cebadores son diagnósticas (pueden identificar de manera unívoca y distinguir) la presencia de un evento de la presente invención.

Los componentes del "inserto" o construcción del transgén han sido descriptos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.605.310 y 7.449.564 (ver *por ej.* la figura 1 de la patente '564). Se pueden utilizar secuencias de polinucleótidos o fragmentos de estos componentes como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, se dan a conocer composiciones y métodos para detectar el número de copias de la región de inserción del transgén/genómica en plantas y semillas y demás, de una planta designada HERCULEX que comprende el evento de *Cry*1F TC1507. Se presentan secuencias de ADN que comprende por lo menos una secuencia de empalme de la región de inserción del transgén/genómica expuestas en la presente en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, segmentos de las mismas y complementos de las secuencias ejemplificada y cualquier segmento de las mismas. La secuencia de empalme de la región de inserción abarca el empalme entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de maíz que flanquea el sitio de inserción. Dichas secuencias son diagnósticas del presente evento.

Basándose en estas secuencias de inserto y borde, se generaron cebadores específicos para el evento. El análisis de PCR Taqman de la presente invención demostró que se puede identificar el evento del maíz TC1507 en diferentes líneas y genotipos de maíz mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estas series de cebadores específicos para el evento. Se pueden utilizar estos y otros procedimientos relacionados para identificar de manera unívoca estas líneas de maíz.

En algunas realizaciones, las secuencias de ADN que comprenden (o son complementarias, por lo menos en parte) de una porción/segmento contiguo de las regiones de inserción del transgén/genómica constituyen un aspecto de esta invención. Se incluyen las secuencias de ADN que comprenden un tramo suficiente de polinucleótidos de la secuencia de inserto del transgén y un tramo suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica del maíz de una o más plantas de maíz de la presente.

Las realizaciones relacionadas se refieren a secuencias de ADN que comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos contiguos de una porción del transgén de una secuencia de ADN de SEC ID NO: 3, o complementos de la misma y un tramo similar de una secuencia de ADN flanqueante de maíz seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, o complementos de las mismas. Dichas secuencias son útiles, por ejemplo, como cebadores de ADN o métodos de amplificación de ADN. Los componentes de la invención incluyen también los amplicones producidos por dichos cebadores de ADN y cebadores homólogos.

Esta invención incluye asimismo métodos para detectar la presencia de ADN en una muestra, de por lo menos una de las plantas de maíz a las que se hace referencia en la presente. Dichos métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN con un juego de cebadores que, al utilizarlos en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención, con ADN de por lo menos uno de estos eventos del maíz, (b) ejecutar una reacción de amplificación de PCR TAQMAN utilizando un gen de referencia identificado en la presente y (c) analizar los resultados.

En algunas realizaciones más, la presente invención incluye métodos para producir una planta de maíz que comprende un evento *cry*1F de la presente invención, donde dicho método comprende los siguientes pasos: (a) cruzar sexualmente una primera línea parental de maíz (que comprende un cassette de expresión de la presente invención, que confiere el rasgo de resistencia a los insectos a las plantas de dicha línea) para producir así una pluralidad de plantas de la progenie y (b) seleccionar una planta de la progenie basándose en los resultados de por lo menos una técnica de ensayo de la presente invención. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente el paso adicional de retrocruzar la planta de la progenie con la segunda línea parental de maíz para producir una planta de maíz pura para la reproducción que comprende dicho rasgo de tolerancia a los insectos. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se presentan métodos relacionados para determinar la cigosidad de la progenie de una cruza.

Se pueden desarrollar kits de detección de ADN utilizando las composiciones aquí descriptas y métodos muy conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN del presente evento del maíz en una muestra y se pueden aplicar a los métodos para reproducir plantas de maíz que contengan este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias de los amplicones, por ejemplo los descriptos en la presente, o de secuencias de ADN homólogas o complementarias del ADN contenido en los elementos genéticos del transgén de los presentes eventos. Estas secuencias de ADN pueden ser utilizadas en reacciones de amplificación de ADN o en sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits pueden contener

además los reactivos y materiales necesarios para la ejecución del método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la cual está adherido un marcador detectable o molécula reportera (tal como un isótopo radioactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima). Dicha sonda es complementaria de una hebra del ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, o de una hebra del ADN genómico de dichos eventos del maíz, ya sea de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención no sólo incluyen ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN objetivo y pueden ser utilizadas para detectar la presencia de la secuencia de ADN objetivo.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se reasocian a una hebra complementaria de ADN objetivo mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN objetivo y pueden ser utilizados en combinación con una polimerasa, *por ej.*, una ADN polimerasa. Los parees de cebadores de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo, *por ej.* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por otros métodos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos.

Las sondas y cebadores (y amplicones) tienen generalmente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,

98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498,

499 o 500 polinucleótidos o más de longitud. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente a una secuencia objetivo en condiciones de alta rigurosidad. Preferentemente, sondas y cebadores de acuerdo con la presente invención tienen similitud total de secuencias con la secuencia objetivo, aunque se pueden diseñar sondas que difieran de la secuencia objetivo y que retengan la capacidad de hibridarse a secuencias objetivo mediante métodos convencionales.

Los métodos para la preparación y uso de sondas y cebadores han sido descriptos, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., vol. 1–3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Se pueden derivar pares de cebadores de PCR de una secuencia conocida, por ejemplo utilizando programas de computación destinados a ese fin.

Se pueden utilizar los cebadores y sondas basados en las secuencias del ADN flanqueante y el inserto descripto en la presente para confirmar (y, si fuera necesario, corregir) las secuencias descriptas mediante métodos convencionales, *por ej.*, reclonando y secuenciando dichas secuencias.

Las sondas y cebadores de ácido nucleico de la presente invención se hibridan en condiciones rigurosas a una secuencia de ADN objetivo. Se puede utilizar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las mismas son aptas para hibridarse específicamente a otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. En el presente contexto, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas pueden formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice

que una molécula de ácido nucleico es "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si ambas exhiben complementariedad total. En el presente contexto, se dice que las moléculas exhiben "complementariedad total" cuando cada uno de los nucleótidos de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se pueden hibridar entre sí con estabilidad suficiente para permitirles permanecer reasociadas entre sí en condiciones convencionales por lo menos de "baja rigurosidad". Del mismo modo, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre sí con estabilidad suficiente para permitirles permanecer asociadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones convencionales de rigurosidad han sido descriptas por Sambrook *et al.*, 1989. Por lo tanto, los alejamientos de la complementariedad completa son permisibles, siempre que dichos alejamientos no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria en su secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones específicas de solvente y sales empleadas.

En el presente contexto, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que se hibrida específicamente al complemento de la secuencia de ácido nucleico con la cual se la está comparando en condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas" se define funcionalmente con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico objetivo (es decir, a una secuencia de ácido nucleico de interés) mediante el procedimiento de hibridación específico descripto por Sambrook *et al.*, 1989, en

9.52–9.55. Ver además, Sambrook *et al.*, 1989 en 9.47–9.52 and 9.56–9.58. En consecuencia, se pueden emplear las secuencias de nucleótidos de la invención por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos de complementariedad de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación contemplada, se puede utilizar diversos métodos de hibridación para obtener diversos grados de selectividad de la sonda con la secuencia objetivo. Para aplicaciones que requieren alta selectividad, por lo general se emplean condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos; *por ej.*, se seleccionan condiciones de sal relativamente bajas y/o alta temperatura, como por ejemplo NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50° C a aproximadamente 70° C. Las condiciones rigurosas podrían implicar, por ejemplo, el lavado del filtro de hibridación por lo menos dos veces con buffer de lavado de alta rigurosidad (0,2X SSC, 0,1% de SDS, 65° C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN por ejemplo, 6,0X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45° C, seguidas por un lavado con 2,0X SSC a 50° C son conocidas por las personas con capacitación en la técnica, 6.3.1–6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sales en el paso de lavado puede ser seleccionada desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0X SSC a 50° C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2X SSC a 50° C. Además, se puede aumentar la temperatura en el paso de lavado desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22° C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65° C. Se puede variar tanto la temperatura como la sal, o la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes, cambiando la otra variable. Dichas condiciones

selectivas toleran poco, si algún, mal apareamiento entre la sonda y el patrón o hebra objetivo. La detección de secuencias de ADN mediante hibridación es muy conocida por las personas con capacitación en la técnica y los conceptos vertidos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.965.188 y 5.176.995 son ilustrativos de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización especialmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibrida específicamente a uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificados o sugeridos en la presente, incluyendo complementos y fragmentos de los mismos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID NOs: 4–21, o complementos y/o fragmentos de la misma.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente invención comparte entre 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con dichas secuencias de ácido nucleico. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre 95% y 100% e identidad de secuencia con esa otra secuencia. Dichas secuencias pueden ser utilizadas en métodos de reproducción asexual, por ejemplo para identificar la progenie de cruzas genéticas. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN objetivo puede ser detectada por cualquiera de los métodos conocidos por las personas con capacitación en la técnica, que pueden incluir, aunque no a título de limitación, marcas de identificación fluorescentes, marcas de identificación radiactivas, marcas de identificación basadas en anticuerpos y marcas de identificación quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo (*por ej.*, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación específico, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride sólo a la secuencia de ácido nucleico objetivo a la cual se uniría un cebador que tiene la correspondiente secuencia de tipo salvaje (o su complemento) y preferentemente para producir un producto de amplificación singular, el amplicón.

El término "específico para (una secuencia objetivo)" indica que una sonda o cebador se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas sólo a la secuencia objetivo en una muestra que comprende la secuencia objetivo.

En el presente contexto, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico objetivo que es parte de un patrón de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz producida como resultado de una cruza sexual contiene ADN del genómico del evento transgénico de la planta de maíz de la presente invención, se puede someter al ADN extraído de una muestra de tejido de la planta de maíz a un método de amplificación de ácido nucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de una secuencia flanqueante en el genoma de la planta, adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento. El amplicón es de una longitud y tiene una secuencia que también es diagnóstica del evento. El amplicón puede variar en longitud desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases nucleotídicas y/o la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases nucleotídicas y/o la longitud

combinada de los pares de cebadores más aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418,

419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 o más pares de bases nucleotídicas (más o menos cualquiera de los incrementos antes enumerados). Por otro lado, se puede derivar un par de cebadores de la secuencia flanqueante a ambos lados del ADN insertado a fin de producir un amplicón que incluye la secuencia nucleotídica completa de insertada. Puede haber un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de una planta situada a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia puede variar entre una base de nucleótidos hasta aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término “amplicón” excluye específicamente los dímeros cebadores que se puede formar en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico se puede lograr por cualquiera de diversos métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hay una variedad de métodos de amplificación conocidos en la técnica descriptos, entre otros, en la patente de Estados Unidos No. 4.683.195 y la patente de Estados Unidos No. 4.683.202. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para la amplificación de hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, como así también otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN se pueden utilizar para poner en práctica la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo del transgén o la secuencia genómica flanqueante de

un evento del maíz de la presente puede ser verificada (y corregida, si fuera necesario) mediante la amplificación de esas secuencias del evento utilizando cebadores derivados de las secuencias provistas en la presente seguida por secuenciación standard de ADN del amplicón de PCR o del ADN clonado.

Se puede detectar el amplicón producido por estos métodos mediante una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio es un método común muy conocido para detectar amplicones de ADN. Otro método de ese tipo es el Análisis de Bits Genéticos donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto a la secuencia de ADN genómico flanqueante como al la secuencia de ADN insertado. Se inmoviliza el oligonucleótido en los pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador de la secuencia insertada y uno de la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto monocatenario de la PCR al oligonucleótido inmovilizado y esto sirve como patrón para una reacción de prolongación de una sola base utilizando una ADN polimerasa y ddNTPs marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELLISA. Una señal indica la presencia de la secuencia insertada/flanqueante debido a la amplificación, hibridación y prolongación de base única satisfactorias.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisorias y publicaciones mencionadas como referencia o citadas en la presente se incorporan a la presente como referencia en su totalidad en la medida en que no se contradigan con los conceptos explícitos vertidos en esta memoria descriptiva.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Aislamiento de ADN genómico total y cuantificación y amplificación con cebadores de PCR. Se llevó a cabo el aislamiento de ADN genómico de homocigotas, hemicigotas de Cry1F y muestras de tipo salvaje de las muestras individuales troquelando ocho discos foliares por muestra y moliendo los discos hasta obtener un polvo fino utilizando un Genogrinder 2000. Se extrajo el ADN empleando kits para plantas ChargeSwitch® gDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) o los kits Qiagen DNeasy de 96 pocillos (Valencia, CA). Con anterioridad a la PCR, se cuantificaron muestras de ADN con el kit de Cuantificación Quant–iT™ PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando las instrucciones del fabricante.

Se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos y sondas TaqMan con doble marca con FAM y desactivador Black Hole quencher 1 (BHQ1) mediante MWG Biotech (High Point, NC) (Tabla 1b).

Tabla 1b. Secuencias de los Cebadores y Sondas TaqMan con Doble Marca

gen	No. de acceso	nombre oligo	nombre original	secuencia	SEC ID NO:	longitud del producto de PCR
Cry1F		TC1507–F	MaiY–F1	5'–TAGTCTTCGGCCAGAATGG–3'	4	
		TC1507–R	MaiY–R3	5'–CTTTGCCAAGATCAAGCG–3'	5	58
		TC1507–P	MaiY–S1	5'–FAM–TAACTCAAGGCCCTCACTCCG–BHQ1–3'	6	
ivr	U16123	ivr104–F	INV104–F	5'CGCTCTGTACAAGCGTGC3'	7	
		ivr104–R	INV104–R	5'GCAAAGTGTTGTGCTTGGACC3'	8	104
		ivr104–P	INV104–sonda	5'Cy5–CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCT–BHQ2–3'	9	
ivr	U16123	ivr–F		5'TGGCGGACGACGACTTGT3'	10	79
		ivr–R		5'AAAGTTTGGAGGCTGCCGT3'	11	
		ivr–P		5'–Cy5–CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC–BHQ2–3'	12	

		adh–F	5'CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC3'	13	136
adh1	X04050	adh–R	5'CCACTCCGAGACCCTCAGTC3'	14	
		adh–P	5'–Cy5–AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA–BHQ23'	15	
		hmg–F	5'TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA3'	16	79
hmga	AJ131373	hmg–R	5'GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT3'	17	
		hmg–P	5'–Cy5–CAATCCACACAAACGCACGCGTA–BHQ2–3'	18	
		zein–F	5'TGCAGCAACTGTTGGCCTTA3'	19	72
zeína	X07535	zein–R	5'TCATGTTAGGCGTCATCATCTGT3'	20	
		zein–P	5'–Cy5–CATCACTGGCATCGTCTGAAGCGG–BHQ2–3'	21	

Se sintetizaron sondas TaqMan con doble marca con Cy5 y BHQ2 mediante IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se disolvieron todos los cebadores en 1x Tris–EDTA a 200 µM y las sondas a 100 µM. Se diluyeron las reservas de trabajo de los cebadores y las sondas TaqMan con doble marca 10 veces con agua de grado molecular.

Se configuraron las reacciones de PCR de acuerdo con las Tablas 2a, 2b and 2c para las reacciones mono–plex, utilizando concentraciones de $MgCl_2$ de 2,5 mM a 5,5 mM.

Tabla 2a: Mezcla de PCR para cada reacción con un volumen final de 25 µl ($MgCl_2$ 2,5 mM).

Componente	Volumen (µl)
Agua	16,85
buffer 10XPCR (con $MgCl_2$ 15m)	2,5
$MgCl_2$ 25 mM	1
dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)	0,75
Cebador directo – 20 µM	0,25
Cebador inverso – 20 µM	0,25
Sonda con doble marca – 10 µM	0,2
HotStarTaq (5U/µl)	0,2
Patrón de ADN genómico (10ng/µl)	3
Volumen total de la reacción	**25,00**

Tabla 2b: Mezcla de PCR para cada reacción con un volumen final de 25 µl ($MgCl_2$ 4 mM).

Componente	Volumen (µl)
Agua	15,85
buffer 10XPCR (con $MgCl_2$ 15m)	2,5
$MgCl_2$ 25 mM	2
dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)	0,75
Cebador directo – 20 µM	0,25
Cebador inverso – 20 µM	0,25
Sonda con doble marca – 10 µM	0,2
HotStarTaq (5U/µl)	0,2
Patrón de ADN genómico (10ng/µl)	3
Volumen total de la reacción	**25,00**

Tabla 2c: Mezcla de PCR para cada reacción con un volumen final de 25 µl ($MgCl_2$ 5,5 mM).

Componente	Volumen (µl)
Agua	13,85
buffer 10XPCR (con $MgCl_2$ 15m)	2,5
$MgCl_2$ 25 mM	4
dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)	0,75
Cebador directo – 20 µM	0,25
Cebador inverso – 20 µM	0,25
Sonda con doble marca – 10 µM	0,2
HotStarTaq (5U/µl)	0,2
Patrón de ADN genómico (10ng/µl)	3
Volumen total de la reacción	**25,00**

Las reacciones de PCR para las reacciones múltiples fueron configuradas de acuerdo con la Tabla 3. Se utilizó la ADN polimerasa Taq HotStar (HotStar Taq, 10x Buffer de PCR y $MgCl_2$ 25 mM) de Qiagen (Valencia, CA, # de Catálogo

203203 o 203205) y Mezcla Nucleotídica dNTP 10 mM de Applied Biosystems (Foster City, CA, # de Catálogo N8080260). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en una disposición óptica iCiclor (BioRad, Hercules, CA) comenzando con 15 minutos de desnaturalización a 95°C según la recomendación, seguida por 50 ciclos de 95 °C por espacio de 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto. Se registraron las señales de fluorescencia al final de cada ciclo.

Los ensayos de PCR TaqMan de punto final fueron establecidos de acuerdo con la Tabla 3. Se utilizó la Disposición de PCR ABI GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para la amplificación. Se midieron los productos de PCR ya sea mediante E–Gel al 4% (Invitrogen, Carlsbad, CA) o mediante un espectrofluorómetro (Tecan GENios, Männedorf, Suiza) después de un número óptimo de ciclos, que se determinó que era de 28 ciclos (Tabla 4).

Tabla 3: Mezcla de PCR para cada reacción biplex con un volumen final de 25 µl.

Componente	Volumen (µl)
Agua	13,15
buffer 10XPCR (con $MgCl_2$ 15m)	2,5
$MgCl_2$ 25 mM	4
dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)	0,75
Cebador directo TC1507 – 20 µM	0,25
Cebador inverso TC1507 – 20 µM	0,25
Sonda TC1507 con doble marca – 10 µM	0,2
Cebador directo endógeno – 20 µM	0,25
Cebador inverso endógeno – 20 µM	0,25
Sonda *Endógena* con doble marca – 10 µM	0,2
HotStarTaq (5U/µl)	0,2
Patrón de ADN genómico	3
Volumen total de la reacción	**25,00**

Tabla 4: Configuración del Instrumento con las longitudes de onda recomendadas para la lectura de los productos de PCR.

Tintura	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM	485	535
Cy5	612	670

El umbral de PCR en tiempo real fue calculado automáticamente por el software iCiclor (versión 3.0a), con un valor de fluorescencia ligeramente superior al fondo. Se determinó el ciclo umbral (valor Ct) por el número de ciclos necesarios para generar fluorescencia por encima del umbral establecido. Se estimaron las eficiencias de PCR sobre la base del ADN genómico ingresado y los valores Ct.

Se calcularon las relaciones de señal sobre fondo de FAM contra Cy5. Se representaron los valores absolutos de las relaciones correspondientes a cada población en Excel. Las aciertos de genotipos se basaron en los controles (homocigotas, hemicigotas y de tipo salvaje), como así también en las distribuciones agrupadas de las poblaciones segregadas.

Ejemplo 2 – Eficiencia de PCR correspondientes a los genes endógenos de maíz. Un aspecto del desarrollo de un ensayo de cigosidad TaqMan de punto final fue la selección del gen endógeno más adecuado como gen de referencia. Elegimos la invertasa, un gen de referencia adecuado, que es específico de la especie y tiene un bajo número de copias en el genoma. En un principio se investigaron cuatro genes endógenos del maíz, *alcohol deshidrogenasa* 1 (*adh*1), proteína a del grupo de alta movilidad (*hmg*a), *invertasa* (*ivr*), y *zeína* (*zein*), de los

miles de posibilidades, como posibles genes de referencia Cry1F del maíz en el evento TC1507.

El proceso de selección de un gen de referencia adecuado conllevó agrupar, en primer lugar, 30 ng de homocigotas, hemicigotas de Cry1F extraídos y controles de ADN genómico del maíz de tipo salvaje (extraídos de acuerdo con el procedimiento de aislamiento descripto en este Ejemplo) para estimar la eficiencia de PCR de todos los cebadores. La PCR correspondiente a TC1507 y los cinco genes de referencia seleccionados inicialmente (ivr, ivr104, adh, hmg, zein) fue configurada de acuerdo con la Tabla 2c. A continuación se visualizaron los productos de PCR al cabo de 32 conE–gel al 4%. Todos los cebadores amplificaron los fragmentos de tamaño estimado y cuatro genes de referencia tuvieron bandas con similares intensidades. El ensayo de la opción de gen de referencia adh produjo menos producto que los otros ensayos con genes de referencia seleccionados inicialmente. Los oligos específicos del evento TC1507 sólo produjeron amplicones en los controles homocigotos y hemicigotos, con una banda más luminosa en el caso de las muestras homocigotas.

En el caso del ensayo TaqMan de punto final, se amplificaron tanto las reacciones del transgén como del gen de referencia en una reacción única (múltiplex). En un intento por obtener eficiencias de PCR óptimas para ambos genes, se analizaron todos los cebadores por triplicado con concentraciones variadas de $MgCl_2$ en 30 ng de ADN genómica de las muestras homocigotas utilizando PCR en tiempo real (ver las Tablas 2a, 2b y 2c).

La Tabla 5 presenta los valores Ct de la PCR en tiempo real correspondiente a *ivr*, *adh*, *ivr104*, *hmg*, *zein* y TC1507 con 30 ng de ADN genómico de homocigotas Cry1F en diferentes concentraciones de $MgCl_2$.

Tabla 5

$MgCl_2$	*ivr*	*adh*	*ivr104*	*hmg*	*Zein*	TC1507
2,5mM	25,6	26,2	25,7	23,95	25,4	21,75
4mM	25,85	28,45	24,95	23,3	20,9	21,15
5,5mM	25,15	26,15	24,7	23,2	20,65	20,65

Los valores medios del umbral de los ciclos (Ct) correspondientes a l gen de referencia de zeína seleccionado inicialmente y TC1507 fueron similares (aproximadamente 21) con una elevada concentración de $MgCl_2$ (4 mM y 5,5 mM), en tanto que los valores medios correspondientes a los genes de referencia ivr y hmg seleccionados inicialmente tuvieron valores Ct más elevados (de ~ 23 a ~25). El gen de referencia adh seleccionado inicialmente tuvo valores Ct superiores a 26 y se lo eliminó como opción. La concentración de MgCl2 de 5,5mM arrojó el valor Ct más bajo para la reacción de amplificación de todos los genes analizados y, por consiguiente, se la utilizó en los experimentos subsiguientes.

Se multiplexaron los cebadores para los genes de referencia inicialmente seleccionados ivr, ivr104, hmg y zein con TC1507 usando PCR en tiempo real de acuerdo con la Tabla 3, cono una dilución en serie 1:2 del ADN de las homocigotas agrupadas (ejecutada por triplicado).

Una vez más se utilizaron los valores Ct para comparar las eficiencias de la PCR. **La figura 2** ilustra combinaciones biplex de TC1507 don los diferentes genes de referencia investigados. Los valores Ct de TC1507 demostraron aproximadamente un ciclo de diferencia entre cada dilución. La eficiencia de PCR en el caso de TC1507 fue de 100%. Los genes de referencia exhibieron tan buena eficiencia como las reacciones con TC1507 en la mayoría de las diluciones.

Ejemplo 3 – Análisis de ensayo TaqMan de punto final para la determinación de genotipos de cigosidad. Se utilizó una población de pila simple de Cry1F (Q:07K:PF04DS_ZYGO), con segregación de TC1507, para evaluar la formación de múltiplex de un gen de referencia (ivr, ivr104, hmg o zein) con TC1507 utilizando PCR TaqMan de punto final (Tabla 3). Con anterioridad a la PCR TaqMan de punto final, se normalizó el ADN a 10 ng/µl. Se interrumpieron las reacciones de PCR TaqMan a los 28 ciclos y luego se las midió con un espectrofluorómetro. Se calcularon las señales de fluorescencia de FAM (TC1507) sobre el fondo (H_2O), como señal sobre fondo 1 (SOB1), y Cy5 (gen de referencia) sobre fondo 2 (SOB2). Se representaron las relaciones de SOB1/SOB2 en forma de tratado de difusión en Excel. En una población con segregación, se deben obtener tres grupos de puntos de datos dejando que los puntos de corte se determinen visualmente. Se descubrió que sólo Ivr104 multiplexado con TC1507 en las condiciones de reacción aquí descriptas podría tener aciertos genotípicos inequívocos. Las otras reacciones con los genes de referencia seleccionados inicialmente (ivr, hmg y zein) no llegaron a producir una separación suficiente entre homocigotas y hemicigotas para determinar aciertos genotípicos inequívocos.

Ejemplo 4 – Uso del protocolo con poblaciones diferentes. Se sabe que el análisis de cigosidad invader y basado en PCR (5) puede ser afectado por los antecedentes genéticos de las plantas. Se analizó el ensayo de cigosidad TaqMan de punto final para el evento de Herculex I TC1507 para determinar el efecto que tienen en el mismo los antecedentes genéticos de las plantas con tres poblaciones, de diferentes trasfondos genéticos. Cada fondo consistió en 184 muestras (don placas de ADN de 96 pocillos). Las tres poblaciones fueron: pilas dobles de Cry34/35_PoCry1F y PoCry1F_NK603 y pila simple de PoCry1F. Como

se ilustra en la **figura 4a** y **la figura 4b**, tanto Cry34/35_PoCry1F como PoCry1F produjeron los tres cúmulos típicos con homocigotas en la parte superior, hemicigotas en la parte media y el tipo salvaje (WT) en la base, en tanto que PoCry1F_NK603 (**Figura 4c**) sólo tuvo dos cúmulos (homocigotas y hemicigotas) dado que las plantas WT, como se esperaba, no sobrevivieron al rocío con herbicidas. Comparando los resultados con los ensayos Invader, 98,8% de las puntuaciones son iguales entre ambos análisis. En siete plantas con discrepancia de puntuación, 6 homocigotas del ensayo Invader resultaron ser hemicigotas al analizarlas con TaqMan de punto final. Una hemicigota se tornó homocigota.

Un ensayo de cigosidad firme requiere que dos alelos de un gen de interés se distingan claramente en una población a segregar. Como se describe en este estudio, diferentes genes de referencia también pueden contribuir a diferencias significativas de los resultados. Además, los hallazgos de genotipos se deben basar en los cúmulos de datos de cada población.

Se determinó que el gen endógeno del maíz Invertasa era un gen de referencia adecuado para el evento TC1507 del maíz. Por tal motivo, se desarrolló un análisis de cigosidad específico para el evento TC1507 por PCR TaqMan de punto final biplex de alto rendimiento, con capacidad para producir genotipos robustos de acuerdo con el Ejemplo 5.

Ejemplo 5 – Uso de *Invertasa* en la PCR TaqMan de punto final biplex de alto rendimiento para Determinar la Cigosidad del Evento TC1507 de Herculex® I en el Maíz. Se establecen, por lo general, condiciones de PCR y ciclado térmico que amplifiquen tanto las secuencias del transgén como del gen de referencia en un patrón conocido de ADN genómico con unidades de fluorescencia relativa aceptables (RFU). Si el gen endógeno de referencia no se amplifica o si las

secuencias del transgén no se amplifican en las lecturas de fluorescencia 0,5–1 unidad más que el control transgénico, se puede realizar la optimización variando la concentración de los cebadores y/u otros parámetros.

ADN Patrón: Se muestrearon ocho discos foliares por muestra y se preparó ADN patrón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit de Extracción de ADN Genómico (kit DNeasy de 96 pocillos, Qiagen, Valencia, CA, # de Catálogo 69181) o equivalente). (Se puede encontrar una descripción más detallada de algunos materiales adicionales y sus fuentes en el Ejemplo 1.) En general, 30 ng de ADN genómico total por cada 25 μl de reacción dio los mejores resultados.

Sustancias de Ensayo y Control: Las muestras de ADN de maíz control negativo fueron de ADN foliar de maíz no transgénico o transgénico sin contenido del Evento TC1507 *Herculex*® *I*.

Las muestras de ADN de maíz *Herculex*® *I* Evento TC1507 eran muestras de ADN de hojas de maíz transgénico que contenía el Evento TC1507 de *Herculex*® *I* que era hemicigoto u homocigoto. Se puede preparar una muestra hemicigota si no se dispone de una, combinando proporciones iguales de ADN control negativo con ADN de maíz *Herculex*® *I* homocigoto.

Los controles positivos y negativos están ilustrados en la Tabla 6.

Tabla 6

Tipo de Control	**Descripción**	**Resultado Esperado**	**Interpretación**
Control negativo en mezcla maestra	No se agrega ADN a la reacción.	Lecturas de RFU de fondo. No hay productos de PCR	La mezcla no está contaminada.
Control positivo de ADN Homocigoto	Se agrega una muestra de ADN genómico que	Las lecturas de RFU de FAM son por lo	El control exhibe la amplificación del

(*Herculex® I* Evento TC1507)	se sabe que es homocigoto para la secuencia transgénica.	menos una unidad más altas que las del control no transgénico. Lecturas de Cy5 similares al control no transgénico.	transgén (FAM) y alelos del gen endógeno de referencia (Cy5) del ADN genómico.
Control positivo de ADN Homocigoto (*Herculex® I* Evento TC1507)	Se agrega una muestra de ADN genómico que se sabe que es hemicigoto para las secuencias transgénicas y de tipo salvaje.	Las lecturas de RFU de FAM son por lo menos 0,5 unidad más altas que las del control no transgénico. Lecturas de Cy5 similares al control no transgénico.	El control exhibe la amplificación del transgén (FAM) y alelos del gen endógeno de referencia (Cy5) del ADN genómico.
Control negativo de ADN no transgénico	Se agrega una muestra de ADN genómico de una línea no transgénica del mismo trasfondo que las desconocidas.	Las lecturas de fluorescencia de Cy5 son por lo menos 0,5–1 unidad más altas que la del control negativo de fondo.	El control sólo exhibe la amplificación del gen endógeno de referencia (Cy5) y no del transgén (FAM) del ADN genómico.

Procedimiento para la Extracción, Purificación y Cuantificación de ADN. Se llevan a cabo los siguientes pasos en orden consecutivo.

Se troquelan 8 discos foliares por muestra y se los transfiere a tubos de colección Qiagen. Se limpia el troquel después de cada muestreo con alcohol al 70% seguido por un rápido enjuague con agua y luego se seca con un paño.

Se prepara el buffer de extracción de ADN de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se determina la concentración de ADN empleando el Kit de Cuantificación Quant–iT™ PicoGreen® y un espectrofotómetro o equivalente.

Condiciones de PCR. Se llevaron a cabo los siguientes pasos en orden sucesivo. Preparar la siguiente mezcla de reacción como Mezcla Maestra que contiene todos los componentes excepto los patrones de ADN. Al preparar la mezcla, hay que asegurarse de que sea suficiente para 10% más reacciones de las necesarias en realidad.

Los siguientes fueron los componentes para la reacción en biplex con contenido del Evento TC1507 de *Herculex*® *I* y los oligonucleótidos del gen endógeno de *invertasa* (se normalizaron las concentraciones de todas las muestras de ADN):

Componente	**Volumen (µl)**
Agua	13,15
buffer 10XPCR	2,5
$MgCl_2$ 25 mM	4
dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)	0,75
Cebador directo TC1507 – 20 µM	0,25
Cebador inverso TC1507 – 20 µM	0,25
Sonda con doble marca TC1507 – 10 µM	0,2
Cebador directo de Invertasa – 20 µM	0,25
Cebador inverso de Invertasa – 20 µM	0,25
Sonda con doble marca de *Invertasa* – 10 µM	0,2
HotStarTaq (5U/µl)	0,2
Patrón de ADN genómico (10ng/µl)	**3**
Volumen total de la reacción	**25,00**

Se prepararon cebadores y sondas y se los utilizó de la siguiente manera.

Tabla 7. Lista de Secuencias de Cebadores y Sondas.

Nombre del Cebador o Sonda	**Secuencia**
INV104–F (*Cebador directo de Invertasa*)	5'–CGCTCTGTACAAGCGTGC–3' (SEC ID NO: 7)
INV104–R (Cebador inverso de *Invertasa*)	5'–GCAAAGTGTTGTGCTTGGACC–3' (SEC ID NO: 8)
sonda INV104 (sonda marcada de *Invertasa*)	5'–CY5–CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCT–BHQ2–3' (SEC ID NO: 9)
MaiY–F1 (Cebador directo TC1507)	5'–TAGTCTTCGGCCAGAATGG–3' (SEC ID NO: 4)
MaiY–R3 (Cebador inverso TC1507)	5'–CTTTGCCAAGATCAAGCG–3' (SEC ID NO: 5)
MaiY–S1 (Sonda con doble marca TC1507)	5'–FAM–TAACTCAAGGCCCTCACTCCG–BHQ1–3' (SEC ID NO: 6)

Tabla 8. Preparación de soluciones madre de cebadores (200 μM).

Alelo	Directo	nmoles	*Dilución*	Inverso	nmoles	Dilución
Gen de referencia de *Invertasa*	INV104–F	33,2	Adición 166 μl de 1x Tris–EDTA	**INV104–R**	35,0	Adición de 175μl de 1x Tris–EDTA
Herculex I evento TC1507	MaiY–F1	112,5	Adición 562,5 μl de 1x Tris–EDTA	**MAIY–R3**	96,4	Adición de 482 μl de 1x Tris–EDTA

Se tomaron alícuotas de la reserva de cebadores y se las diluyó 1:10 con H_2O hasta obtener una concentración final de trabajo de 20 μM.

Tabla 9. Preparación de soluciones madre (reserva) de sondas (100 μM).

Alelo	Probe	nmoles	*Dilución*
Gen de referencia de *Invertasa*	Sonda INV104	17,3	Se agregan 173,0 μl de 1x Tris–EDTA
Herculex I evento –TC1507	MaiY–S1	16,3	Se agregan 163,0 μl de 1x Tris–EDTA

Se tomaron alícuotas de la reserva de sondas y se las diluyó 1:10 con H_2O hasta obtener una concentración final de 10 μM. Las sondas son fotosensibles y deben ser almacenadas en la oscuridad en lo posible. Se deben preparar múltiples alícuotas de cada sonda para minimizar el número de ciclos de congelación y descongelación.

Se prepararon ensayos de PCR con los controles apropiados. Cuando se utiliza una placa de 96 pocillos, se recomienda utilizar los siguientes pocillos para los controles: H11 – H12 = controles negativos (reactivos pero sin ADN), A1 = control positivo homocigota con contenido de ADN genómico del maíz *Herculex®* / TC1507; A2 = control positivo hemicigota con contenido de ADN genómico del maíz *Herculex®* / TC1507; A3= control negativo con contenido de ADN genómico aunque sin el Evento TC1507 *Herculex®*, and A4 – H10 = muestras desconocidas.

Se amplificó ADN en una Disposición de PCR GenAmp 9700 en las siguientes condiciones:

Elemento del ciclo	**Temp (°C)**	**Tiempo**	**Número de ciclos**
Desnaturalización inicial	95	15 minutos	1
Desnaturalización Reasociación & Extensión	95 60	15 segundos 60 segundos	28

Se analizaron las muestras de la siguiente manera.

Configuración del Instrumento: las longitudes de onda recomendadas para la lectura de los resultados de la PCR son las siguientes.

Tintura	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM (*Herculex®* / TC1507)	485	535
Cy5 (*Invertasa*)	612	670

Las muestras sin contenido del ADN genómico del Evento TC1507 Herculex® I sólo dan lugar lecturas de RFU correspondientes a la sonda de FAM por lo menos 0,5-1 unidad más elevadas que la del control de fondo negativo. Si las muestras no dan productos de PCR para los alelos del transgén o del gen endógeno, el ADN puede no ser de la calidad o cantidad adecuada. En ese caso, se debe realizar la preparación de un nuevo ADN o una nueva reacción. Los resultados son aceptables cuando:

* los controles hemicigotos y homocigotos conocidos exhiben lecturas de fluorescencia relativamente elevadas en el caso del Evento TC1507 *Herculex®* / y el gen de referencia de *invertasa*. Una lectura de 0,5–1,0 unidad debe separar las relaciones SOB1/SOB2 entre los dos controles.

* el control negativo debe exhibir lecturas de fluorescencia muy bajas tanto en el caso de *Herculex®* / Evento TC1507 como en los genes de referencia.

* el ADN control no transgénico debe exhibir la lectura de fluorescencia correspondiente al gen de referencia solamente.

Una vez completada la PCR TaqMan y la lectura de fluorescencia, se generó un gráfico de distribución (Tabla 10, **Figura 1**). Los controles 'de tipo salvaje' (Wt), 'hemicigotos' y 'homocigotos' de similar trasfondo genotípico pueden servir como controles negativos y positivos. En una población para la segregación, se deben obtener tres cúmulos de datos permitiendo la determinación visual de los puntos de corte. Estos puntos de corte son arbitrarios

y la separación entre los cúmulos es habitualmente de aproximadamente 0,5–1 unidad. Sin embargo, los puntos de datos podrían ser difusos debido a la variabilidad del ensayo. En el caso del ejemplo ilustrado a continuación, se distinguen claramente tres cúmulos de datos. Los puntos de datos correspondientes al tipo salvaje son de menos de 0,5, los de las muestras "hemicigotas" están en el rango de 0,5–1,1 y las correspondientes a las 'homocigotas' son superiores a 1,1.

Tabla 10. Ejemplo de Tabla de Datos. Reportero1 = lectura de FAM, Reportero2 = lectura de Cy5, SOB1 = Señal sobre el fondo de FAM (relación de la señal de la muestra sobre el promedio de la señal de fondo a 535 nm), SOB2 = Señal sobre fondo de Cy5 (relación de la señal de la muestra sobre el promedio de la señal de fondo a 670 nm), Relación = SOB1/SOB2 (valor absoluto), Hallazgo = Interpretación de las muestras de tipo salvaje (relación < 0,5), hemicigotas (relación > 0,5 pero < 1,1), y homocigotas (relación > 1,1) correspondientes a *Herculex®* / Evento TC1507.

Tabla 10

Muestra	Pocillos	Reportero1	SOB1	Muestra #	Reportero 2	SOB2	Relación	Hallazgo
Sam1	A5	10807	–16,9	5	35670	114,3	0,1481	Wt
Sam2	A6	24314	86,9	6	33617	101,9	0,8525	Hemi
Sam3	A7	25918	99,2	7	35358	112,4	0,8829	Hemi
Sam4	A8	26255	101,8	8	35989	116,2	0,8764	Hemi
Sam5	A9	37931	191,6	9	37283	124,0	1,5455	Hmz
Sam6	A10	37176	185,8	10	37269	123,9	1,4997	Hmz
Sam7	A11	35059	169,5	11	35899	115,6	1,4657	Hmz
Sam8	A12	45525	250,0	12	43689	162,4	1,5388	Hmz
Sam9	B1	30329	133,1	13	39359	136,4	0,9759	Hemi
Sam10	B2	28052	115,6	14	38354	130,4	0,8869	Hemi
Sam11	B3	33754	159,5	15	37700	126,5	1,2610	Hmz
Sam12	B4	31538	142,4	16	33828	103,2	1,3801	Hmz
Sam13	B5	31319	140,8	17	33242	99,7	1,4120	Hmz
Sam14	B6	26514	103,8	18	36459	119,0	0,8724	Hemi
Sam15	B7	24997	92,2	19	35733	114,7	0,8038	Hemi
Sam16	B8	27446	111,0	20	37665	126,3	0,8790	Hemi
Sam17	B9	34671	166,5	21	34785	109,0	1,5284	Hmz
Sam18	B10	30456	134,1	22	41250	147,8	0,9075	Hemi
Sam19	B11	26476	103,5	23	37491	125,2	0,8268	Hemi
Sam20	B12	26262	101,9	24	36842	121,3	0,8398	Hemi

Al completarse la PCR y las lecturas de fluorescencia, se generó un gráfico de distribución de la manera antes descripta. Ver la **Figura 1**.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow AgroSciences

<120> MÉTODOS TAQMAN DE PUNTO FINAL PARA DETERMINAR LA ZIGOSIDAD DE MAÍZ QUE COMPRENDE EVENTOS TC1507

<130> DAS-P0164

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 2829
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia flanqueante 5'del Evento de Maíz Genéticamente Modificado TC1507

<400> 1
actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60

cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120

ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180

gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240

cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300

ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360

catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480

cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540

tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600

ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660

gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720

ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcacccaccg gaacaaaatg 780

taaccgagaa aggtcggtcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840

taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtacccccaa 900

gactcctaat ctcagctggt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960

gattaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020

cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080

ggcacacctt cggctcgccc gaggcccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140

58

ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggcttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggctc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcgcc cgacccgggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt cttcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactaggtg gattggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
aaattacca 2829

<210> 2
<211> 2346
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia flanqueante 3'del Evento de Maíz Genéticamente Modificado TC1507

<400> 2

ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaattttc 60

atttgcagtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120

caaatcagat tattgactgt catttgtatc aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180

atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa tatttttgcg 240

tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300

gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ccttcatgca tagcacctca 360

ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420

tcctcgggtt ggatcatctc atcaggtcca atcaaatttg tccaagaact catgttagtc 480

gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggtcg 540

acggatcctt caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacaggtggg taggtagaga 600

atacctaggg gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc 660

gggagaaggg gtgccccccg ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggta 720

aaataccggt actcgatttc ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggtatcat 780

cataaaaatg gagtagtatc ctaaattata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc 840

ttatcaaccg gaagtagtgc aaaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt tttactgaga 900

aatgcaaaaa aataaaagtg aagtaagggt gccccataga tatttgatct tgcctcctgt 960

cccccccccc ctttttttcat caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat 1020

tcattgaacc ctagttcggg actgacgggg ctcgaacccg cagcttccgc ctgttcctag 1080

ccttccaggg cccagcgtaa gcaataccag ccacagcacc ctcaacctca gcaaccaacc 1140

aagggtatct atcttgcaac ctctctagat catcaatcca ctcttgtggt gtttgtggct 1200

ctgtcctaaa gttcactgta gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatatca caaaccgcgg 1260

aacacaagaa cgaaagcacc ttttcattct ttcatatact aggggttttt acttggaaaa 1320

gacaatgttc catactaaag gatagctgca gaagccgcca ccgtcttgag gaccttccgg 1380

ggagccagac cggtcgaacc gtgcctccac ttgctaagga gaaagggaaa atcagggcca 1440

ggacatacga aggaggagcc agaacgaaga tatcctaaga tacttactcg ctccgggcca 1500

tgatcaatca tgcctgtggg gaggtctctc gcacctcgat ccatgaaggt accaccgagg 1560

tctgccccgc cgccggcttc ggtaccgtcc tcgccttggg cgcccgaggc acccggggga 1620

tggactgccc aggcgcagcc acgacgaccc aaggatcacc ctcctgcgca gtcggcacga 1680

gcaatagttc tcggggaaca ggcagcttgg cctgactccc cggggtcacc tcaactacct 1740

cggccgaggg gtcaagtacc ccctcagtcc gcccccgctc ttcggaccgg gaccccgacg 1800

tcccggcccc ggataccgac ggcaccagcc cgctcggggg ctggcttgac gacccctggc 1860

ccagcctcag atctgggctg aggccgaggc aggcggccat gtcgtcgtct tcatcatcgt 1920

cttcatcatc gtcgtcgtca tcaggcgtct ccggcgacgg ctcccttggg agcccctccc 1980

tctcctgccg acgacgaagc ctttccaagg catcccgagc ccacgtccgc tcgtgggccc 2040

gagccttctt tgcgtccttc ttctccttcc tcttctccgc ggtgaccctc cgcgcagctc 2100

ggtccaccgc atcctccggg actggtggca gggaaggctt gtgatgccct acctcctgga 2160

gacagacgaa aagtctcagc tatgagaacc gagggcaatc tgacgcaaga aggaagaagg 2220

agcggatact caccagagac acgcacccgc gatcgggacg cattaagggc tgggaaaaag 2280

tgccggcctc taatttcgct accgtgccgt ccacccacct gtggaggtca tcgatgggaa 2340

ggggaa 2346

<210> 3
<211> 11361
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia Contigua correspondiente el Evento de Maíz TC1507 que incluye la secuencia flanqueante 5', el inserto cry1F y la secuencia flanqueante 3'

<400> 3
actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60

cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120

ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180

gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240

cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300

ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360

catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480

cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540

tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600

ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660

gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720

ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcacccaccg gaacaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggtcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtacccccaa 900
gactcctaat ctcagctggt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggctcgccc gaggcccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggcttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggctc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcgcc cgacccgggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt cttcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactaggtg gattggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580

atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
aaattaccac aactggaaga gcggttaccc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
atccgcgggc atgcctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatttt ttttgtcaca cttgtttgaa 3000
gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
tagtactaca ataatatcag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat 3180
gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
tacatccatt tagggtttag ggttaatggt ttttatagac taattttttt agtacatcta 3300
ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctattttag tttttttatt 3360
taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt 3420
taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg 3480
ttaaacgccg tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
ccaagcgaag cagacggcac ggcatctctg tcgctgcctc tggacccctc tcgagagttc 3600
cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
acgtgagccg gcacggcagg cggcctcctc ctcctctcac ggcacggcag ctacggggga 3720
ttcctttccc accgctcctt cgctttccct tcctcgcccg ccgtaataaa tagacacccc 3780
ctccacaccc tctttcccca acctcgtgtt gttcggagcg cacacacaca caaccagatc 3840
tcccccaaat ccacccgtcg gcacctccgc ttcaaggtac gccgctcgtc ctcccccccc 3900
ccccctctct accttctcta gatcggcgtt ccggtccatg gttagggccc ggtagttcta 3960
cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttcgt 4020
acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt tctgattgct aacttgccag tgtttctctt 4080
tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc cgcagacggg atcgatttca tgatttttt 4140
tgtttcgttg catagggttt ggtttgccct tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact 4200
tgtttgtcgg gtcatctttt catgcttttt tttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt 4260
tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa 4320
ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg 4380
gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgcgggt tttactgatg catatacaga 4440

gatgcttttt gttcgcttgg ttgtgatgat gtggtgtggt tgggcggtcg ttcattcgtt 4500
ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact acctggtgta tttattaatt ttggaactgt 4560
atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatctag 4620
gataggtata catgttgatg tgggttttac tgatgcatat acatgatggc atatgcagca 4680
tctattcata tgctctaacc ttgagtacct atctattata ataaacaagt atgttttata 4740
attattttga tcttgatata cttggatgat ggcatatgca gcagctatat gtggattttt 4800
ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg cttggtactg tttcttttgt cgatgctcac 4860
cctgttgttt ggtgttactt ctgcaggtcg actctagagg atccaacaat ggagaacaac 4920
atacagaatc agtgcgtccc ctacaactgc ctcaacaatc ctgaagtaga gattctcaac 4980
gaagagaggt cgactggcag attgccgtta gacatctccc tgtcccttac acgtttcctg 5040
ttgtctgagt ttgttccagg tgtgggagtt gcgtttggcc tcttcgacct catctggggc 5100
ttcatcactc catctgattg gagcctcttt cttctccaga ttgaacagtt gattgaacaa 5160
aggattgaga ccttggaaag gaatcgggcc atcactaccc ttcgtggctt agcagacagc 5220
tatgagatct acattgaagc actaagagag tgggaagcca atcctaacaa tgcccaactg 5280
agagaagatg tgcgtatacg ctttgctaac acagatgatg ctttgatcac agccatcaac 5340
aacttcaccc ttaccagctt cgagatccct cttctctcgg tctatgttca agctgctaac 5400
ctgcacttgt cactactgcg cgacgctgtg tcgtttgggc aaggttgggg actggacata 5460
gctactgtca acaatcacta caacagactc atcaatctga ttcatcgata cacgaaacat 5520
tgtttggata cctacaatca gggattggag aacctgagag gtactaacac tcgccaatgg 5580
gccaggttca atcagttcag gagagacctt acacttactg tgttagacat agttgctctc 5640
tttccgaact acgatgttcg tacctatccg attcaaacgt catcccaact tacaagggag 5700
atctacacca gttcagtcat tgaagactct ccagtttctg cgaacatacc caatggtttc 5760
aacagggctg agtttggagt cagaccaccc catctcatgg acttcatgaa ctctttgttt 5820
gtgactgcag agactgttag atcccaaact gtgtggggag gacacttagt tagctcacgc 5880
aacacggctg gcaatcgtat caactttcct agttacgggg tcttcaatcc cgggggcgcc 5940
atctggattg cagatgaaga tccacgtcct ttctatcgga ccttgtcaga tcctgtcttc 6000
gtccgaggag gctttggcaa tcctcactat gtactcggtc ttaggggagt ggcctttcaa 6060
caaactggta cgaatcacac ccgcacattc aggaactccg ggaccattga ctctctagat 6120
gagataccac ctcaagacaa cagcggcgca ccttggaatg actactccca tgtgctgaat 6180
catgttacct ttgtgcgctg gccaggtgag atctcaggtt ccgactcatg gagagcacca 6240
atgttctctt ggacgcatcg tagcgctacc cccacaaaca ccattgatcc agagagaatc 6300

actcagattc ccttggtgaa ggcacacaca cttcagtcag gaactacagt tgtaagaggg 6360
ccggggttca cgggaggaga cattcttcga cgcactagtg gaggaccatt cgcgtacacc 6420
attgtcaaca tcaatgggca acttccccaa aggtatcgtg ccaggatacg ctatgcctct 6480
actaccaatc taagaatcta cgttacggtt gcaggtgaac ggatctttgc tggtcagttc 6540
aacaagacaa tggataccgg tgatccactt acattccaat ctttctccta cgccactatc 6600
aacaccgcgt tcacctttcc aatgagccag agcagtttca cagtaggtgc tgataccttc 6660
agttcaggca acgaagtgta cattgacagg tttgagttga ttccagttac tgccacactc 6720
gagtaaggat ccgtcgacct gcagccaagc tttcgcgagc tcgagatccc cgacatatgc 6780
cccggtttcg ttgcgactaa catgagttct tggacaaatt tgattggacc tgatgagatg 6840
atccaacccg aggatatagc aaagctcgtt cgtgcagcaa tggaacggcc aaaccgtgct 6900
tttgtcccca agaatgaggt gctatgcatg aaggaatcta cccgttgatg tccaacagtc 6960
tcagggttaa tgtctatgta tcttaaataa tgttgtcggt attttgtaat ctcatataga 7020
ttttcactgt gcgacgcaaa aatattaaat aaatattatt attatctacg ttttgattga 7080
gatatcatca atattataat aaaaatatcc attaaacacg atttgataca aatgacagtc 7140
aataatctga tttgaatatt tattaattgt aacgaattac ataaagatcg aatagaaaat 7200
actgcactgc aaatgaaaat taacacatac taataaatgc gtcaaatatc tttgccaaga 7260
tcaagcggag tgagggcctc atatccggtc tcagttacaa gcacggtatc cccgaagcgc 7320
gctccaccaa tgccctcgac atagatgccg ggctcgacgc tgaggacatt gcctaccttg 7380
agcatggtct cagcgccggc tttaagctca atcccatccc aatctgaata tcctatcccg 7440
cgcccagtcc ggtgtaagaa cgggtctgtc catccacctc tgttgggaat tccggtccgg 7500
gtcacctttg tccaccaaga tggaactgcg gccgcggacc gaattcccat ggagtcaaag 7560
attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaagactg gcgaacagtt catacagagt 7620
ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tggtggagca cgacacgctt 7680
gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat tgagactttt 7740
caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat ctgtcacttt 7800
attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga 7860
aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtggtccca aagatggacc cccacccacg 7920
aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 7980
gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc 8040
tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacagggt acccggggat ccaccatgtc 8100
tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg 8160

65

tgatatcgtt aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac 8220
accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 8280
tgaggttgag ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 8340
ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtcacat aggcatcaaa ggttgggcct 8400
aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaaggtt ttaagtctgt 8460
ggttgctgtt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 8520
cacagcccgg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttgg 8580
tttttggcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttaccca 8640
gatctgagtc gacctgcagg catgcccgct gaaatcacca gtctctctct acaaatctat 8700
ctctctctat aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg aattagggtt cttatagggt 8760
ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt atttgtattt gtaaaatact 8820
tctatcaata aaatttctaa ttcctaaaac caaaatccag tggcgagctc gaattcgagc 8880
tcgagcccgg gtggatcctc tagagtcgac ctgcagaagc ttcggtccgg cgcgcctcta 8940
gttgaagaca cgttcatgtc ttcatcgtaa gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg 9000
gcctaactca aggccctcac tccgcttgat cttggcaaag atatttgacg catttattag 9060
tatgtgttaa ttttcatttg cagtgcagta ttttctattc gatctttatg taattcgtta 9120
caattaataa atattcaaat cagattattg actgtcattt gtatcaaatc gtgtttaatg 9180
gatattttta ttataatatt gatgatatct caatcaaaac gtagataata ataatattta 9240
tttaatattt ttgcgtcgca cagtgaaaat ctatatgaga ttacaaaata ccgacaacat 9300
tatttaagaa acatagacat taaccctgag actgttggac atcaacgggt agattccttc 9360
atgcatagca cctcattctt ggggacaaaa gcacggtttg gccgttccat tgctgcacga 9420
acgagctttg ctatatcctc gggttggatc atctcatcag gtccaatcaa atttgtccaa 9480
gaactcatgt tagtcgcaac gaaaccgggg catatgtcgg gtatctcgag ctcgcgaaag 9540
cttggctgca ggtcgacgga tccttcaaca aaagggtacc tgtacccgaa accgacacag 9600
gtgggtaggt agagaatacc taggggcgcg agacaactct ctctaaggaa ctcggcaaaa 9660
tagccccgta acttcgggag aaggggtgcc ccccgctaac aataaacgaa tacggtttat 9720
gtatggattc cggtaaaata ccggtactcg atttcataag agtcgaatag gaagttaaga 9780
tgagggtggt atcatcataa aaatggagta gtatcctaaa ttatactaat ccacgtatga 9840
tatgtatgcc tttccttatc aaccggaagt agtgcaaaaa aaattctata ctgcactgct 9900
ctctttttac tgagaaatgc aaaaaaataa aagtgaagta agggtgcccc atagatattt 9960
gatcttgcct cctgtccccc cccccctttt ttcatcaaaa atttccatga aaaaagaaaa 10020

66

gatgaatttg tccattcatt gaaccctagt tcgggactga cggggctcga acccgcagct 10080
tccgcctgtt cctagccttc cagggcccag cgtaagcaat accagccaca gcaccctcaa 10140
cctcagcaac caaccaaggg tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt 10200
gtggtgtttg tggctctgtc ctaaagttca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga 10260
tatcacaaac cgcggaacac aagaacgaaa gcaccttttc attctttcat atactagggg 10320
tttttacttg gaaaagacaa tgttccatac taaaggatag ctgcagaagc cgccaccgtc 10380
ttgaggacct tccggggagc cagaccggtc gaaccgtgcc tccacttgct aaggagaaag 10440
ggaaaatcag ggccaggaca tacgaaggag gagccagaac gaagatatcc taagatactt 10500
actcgctccg ggccatgatc aatcatgcct gtggggaggt ctctcgcacc tcgatccatg 10560
aaggtaccac cgaggtctgc cccgccgccg gcttcggtac cgtcctcgcc ttgggcgccc 10620
gaggcacccg ggggatggac tgcccaggcg cagccacgac gacccaagga tcaccctcct 10680
gcgcagtcgg cacgagcaat agttctcggg gaacaggcag cttggcctga ctccccgggg 10740
tcacctcaac tacctcggcc gaggggtcaa gtaccccctc agtccgcccc cgctcttcgg 10800
accgggaccc cgacgtcccg gccccggata ccgacggcac cagcccgctc gggggctggc 10860
ttgacgaccc ctggcccagc ctcagatctg ggctgaggcc gaggcaggcg gccatgtcgt 10920
cgtcttcatc atcgtcttca tcatcgtcgt cgtcatcagg cgtctccggc gacggctccc 10980
ttgggagccc ctccctctcc tgccgacgac gaagcctttc caaggcatcc cgagcccacg 11040
tccgctcgtg ggcccgagcc ttctttgcgt ccttcttctc cttcctcttc tccgcggtga 11100
ccctccgcgc agctcggtcc accgcatcct ccgggactgg tggcagggaa ggcttgtgat 11160
gccctacctc ctggagacag acgaaaagtc tcagctatga gaaccgaggg caatctgacg 11220
caagaaggaa gaaggagcgg atactcacca gagacacgca cccgcgatcg ggacgcatta 11280
agggctggga aaaagtgccg gcctctaatt tcgctaccgt gccgtccacc cacctgtgga 11340
ggtcatcgat gggaagggga a 11361

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
tagtcttcgg ccagaatgg 19

<210> 5
<211> 18

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
ctttgccaag atcaagcg 18

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 6
taactcaagg ccctcactcc g 21

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
cgctctgtac aagcgtgc 18

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
gcaaagtgtt gtgcttggac c 21

<210> 9
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 9
cacgtgagaa tttccgtcta ctcgagcct 29

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
tggcggacga cgacttgt 18

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
aaagtttgga ggctgccgt 19

<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 12
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 13
cgtcgtttcc catctcttcc tcc 23

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 14
ccactccgag accctcagtc 20

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda

<400> 15
aatcagggct cattttctcg ctcctca 27

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 16
ttggactaga aatctcgtgc tga 23

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 17
gctacatagg gagccttgtc ct 22

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 18
caatccacac aaacgcacgc gta 23

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 19
tgcagcaact gttggcctta 20

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 20
tcatgttagg cgtcatcatc tgt 23

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 21
catcactggc atcgtctgaa gcgg 24

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia: | Fecha: | Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: Salida: Traslado: Convenio:

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Cons	Item
1	12-121231-0		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones

folio 71 CD
listado de Sociedades

REIVINDICACIONES

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

1. Un método para determinar la cigosidad de un evento TC1507 en un tejido de *Zea mays*, donde dicho evento TC1507 comprende el constructo de un transgén que comprende un gen cry1F, método que comprende utilizar un ensayo de PCR Taq de punto final basado en fluorescencia para detectar dicho evento TC1507 y un gen de referencia endógeno donde dicho método comprende:

obtener una muestra de ADN genómico de dicho tejido de *Zea mays*,

poner en contacto a dicha muestra con

a. cebador directo para el evento y un cebador inverso para el evento, donde por lo menos uno de dichos cebadores para el evento se une específicamente a dicho constructo de transgén y donde dichos cebadores producen un amplicón del evento diagnóstico de dicho evento cuando éste esta presente en dicha muestra

b. un cebador directo de referencia y un cebador inverso de referencia que producen un amplicón de referencia de dicho gen endógeno de referencia

c. una sonda fluorescente para el evento que se hibrida con dicho amplicón del evento

d. una sonda fluorescente para el evento que se hibrida con dicho amplicón de referencia

cuantificar dicha sonda fluorescente del evento que se ha hibridado a dicho amplicón del evento

cuantificar dicha sonda fluorescente de referencia que se ha hibridado a dicho amplicón de referencia,

comparar las cantidades de la sonda fluorescente hibridada del evento con la sonda fluorescente hibridada de referencia y

determinar la cigosidad de TC1507 comparando las relaciones de florescencia de la sonda fluorescente hibridada del evento y la sonda fluorescente hibridada de referencia.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual un cebador del evento se hibrida a una secuencia flanqueante de TC1507 y un cebador del evento se hibrida a dicho constructo transgénico.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual dicha secuencia flanqueante de TC1507 es seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual dicho constructo transgénico consiste en los residuos 2830–9015 de SEC ID NO: 3.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho gen de referencia es el gen endógeno de invertasa de *Zea mays*.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual dicha secuencia flanqueante abarca los residuos 2629–2829 de SEC ID NO: 3.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual dicha secuencia flanqueante abarca los residuos 9016–9216 de SEC ID NO: 3.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 donde dicho método se utiliza para la reproducción de la introgresión del evento TC1507 en otra línea de maíz.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicha otra línea de maíz es una línea *Zea mays* sin TC1507.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho amplicón del evento tiene 58 pares de bases.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el cual dicho gen de referencia comprende o se hibrida a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 y SEC ID NO: 9.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dichos cebadores de referencia comprenden SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 8, y dicha sonda de referencia comprende SEC ID NO: 9.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dichas sondas están marcadas con una tintura fluorescente y un desactivador.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13 en el cual dicha sonda del evento comprende FAM como tintura fluorescente en el extremo 5' de dicha sonda del evento y un Black Hole Quencher 1 (BHQ1) como desactivador en el extremo 3' de dicha sonda del evento.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho gen de referencia es un gen endógeno conservado del maíz con capacidad para la amplificación por PCR de una sola o un bajo número de copias.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 13 en el cual dicha sonda de referencia está marcada con Cy5 en el extremo 5' de dicha sonda de referencia y un Black Hole Quencher 2 (BHQ2) en el extremo 3' de dicha sonda de referencia.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 12 en el cual dicho amplicón de referencia es un fragmento de 104 pares de bases amplificado por dichos cebadores.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicha sonda de referencia comprende SEC ID NO: 9.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho cebador directo de referencia comprende SEC ID NO: 7 y dicho cebador inverso de referencia comprende SEC ID NO: 8.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, los resultados del cual son leídos directamente en un lector de placas.

21. El método de acuerdo con 1 en el cual dicha muestra es obtenida de una planta de maíz en un campo.

22. Un kit para poner en práctica el método de acuerdo con la reivindicación 1, kit que comprende

a. un cebador directo del evento y un cebador inverso del evento, donde por lo menos uno de dichos cebadores del evento se une específicamente a dicho constructo del transgén cry1F, y donde dichos cebadores producen un amplicón del evento que es diagnóstico de dicho evento, cuando éste está presente en dicha muestra;

b. un cebador directo de referencia y un cebador inverso de referencia que producen un amplicón de referencia a partir de dicho gen endógeno de referencia;

c. una sonda del evento que se hibrida a dicho amplicón del evento y

d. una sonda de referencia que se hibrida a dicho amplicón de referencia.

p. de: DOW AGROSCIENCES LLC

76

RESUMEN

Se da a conocer un método para el análisis de cigosidad del evento TC1507 del maíz Cry1F. El método produce cebadores específicos para el evento TC1507 y cebadores específicos para el gen de referencia y combinaciones de sondas TaqMan para usar en un ensayo de PCR TaqMan biplex de punto final con capacidad para producir hallazgos de genotipos fuertes para asistir en la reproducción molecular de TC1507.

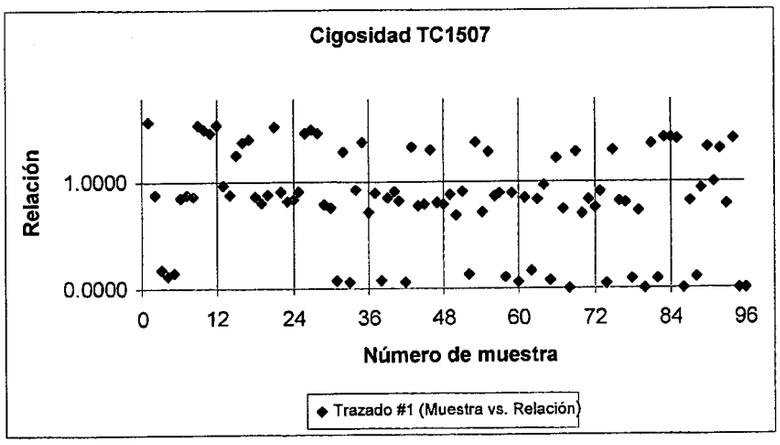
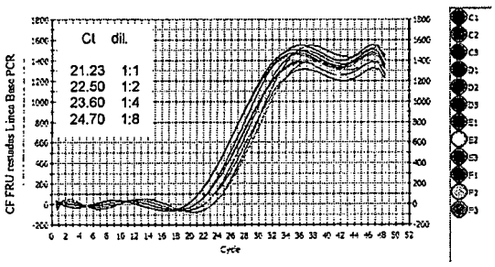
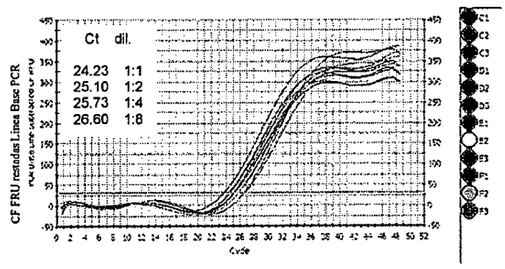

Cigosidad TC1507
Relación
1.0000
0.0000
0
12
24
36
48
60
72
84
96
Número de muestra
Trazado #1 (Muestra vs. Relación)

FIG. 1

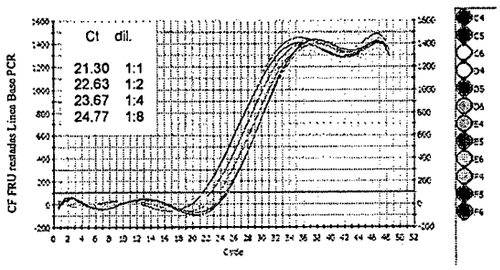
2A: TC1507



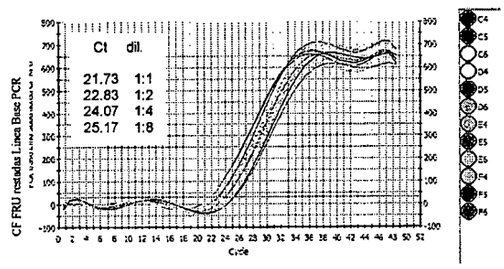
ivr



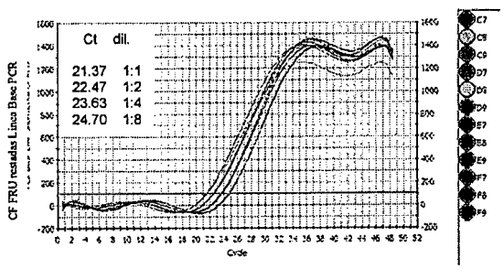
2B: TC1507



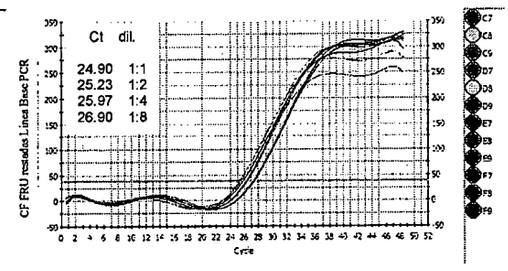
hmg



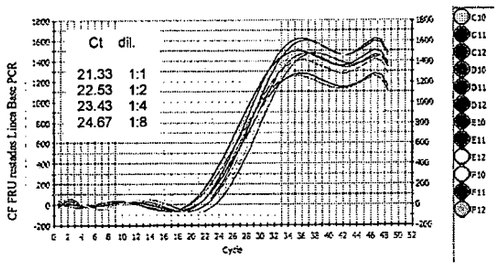
2C: TC1507



ivr104



2D: TC1507



zein

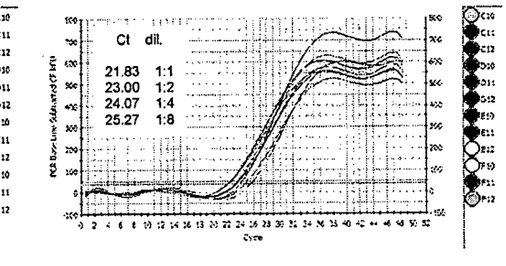
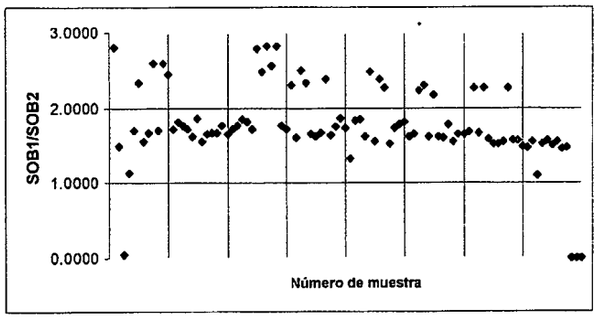
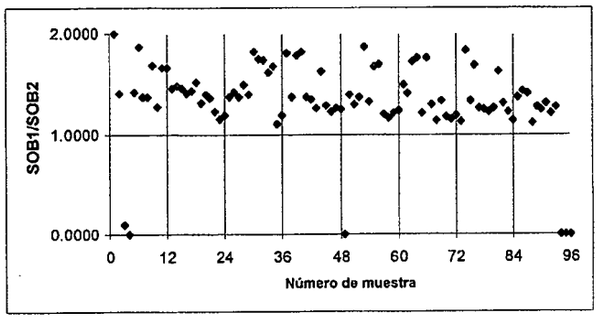


FIG. 2

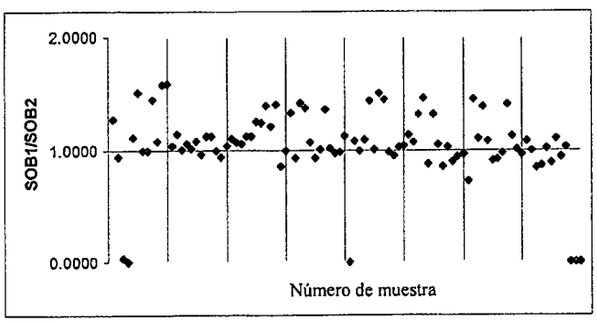
a: *ivr104*



b: *ivr*



c: *hmg*



d: *zein*

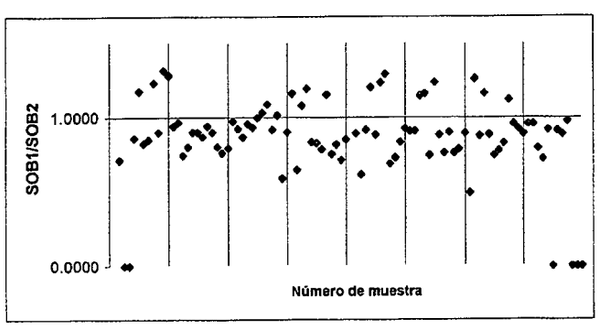


FIG. 3

Pila Cry34/35_PoCry1F

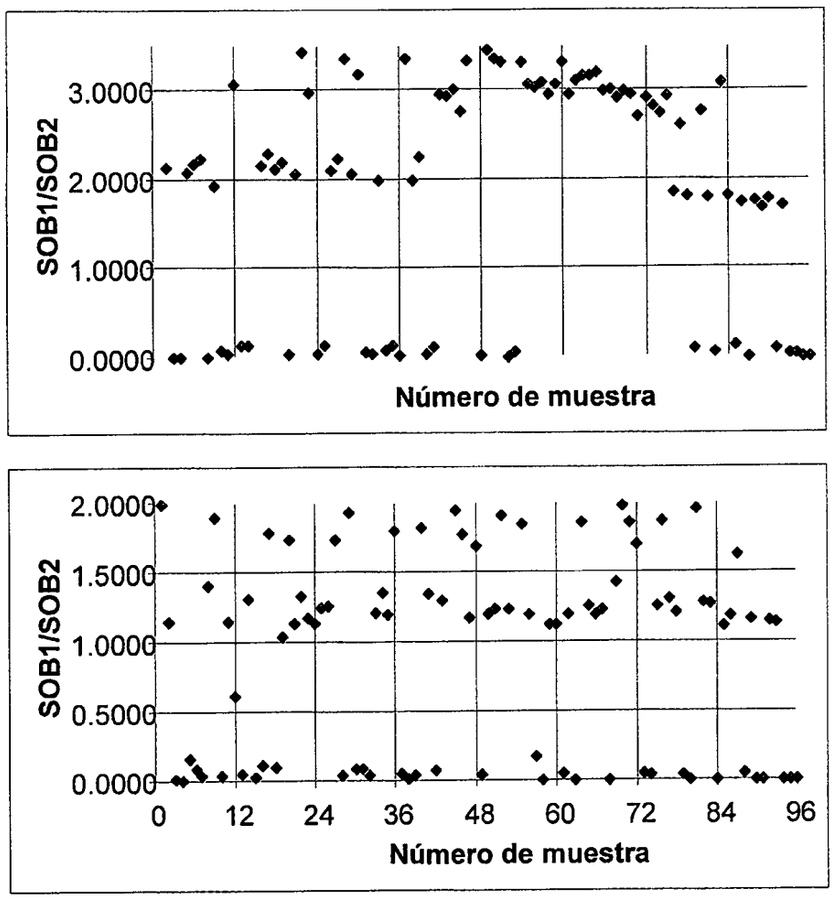


FIG. 4 A

Pila simple PoCry1F

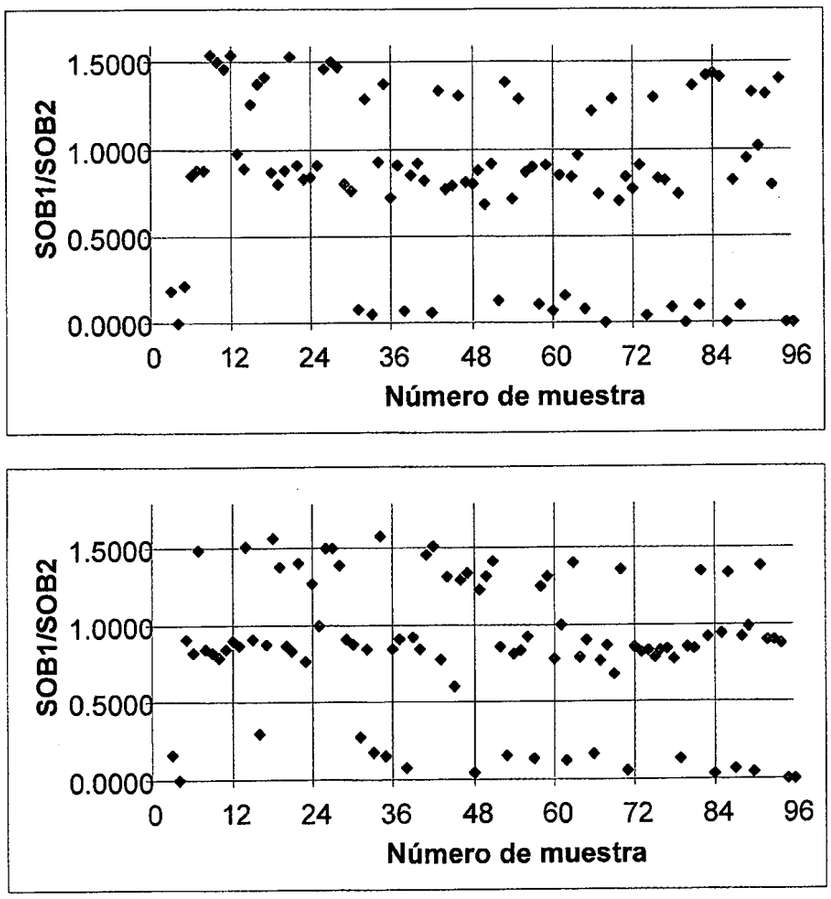
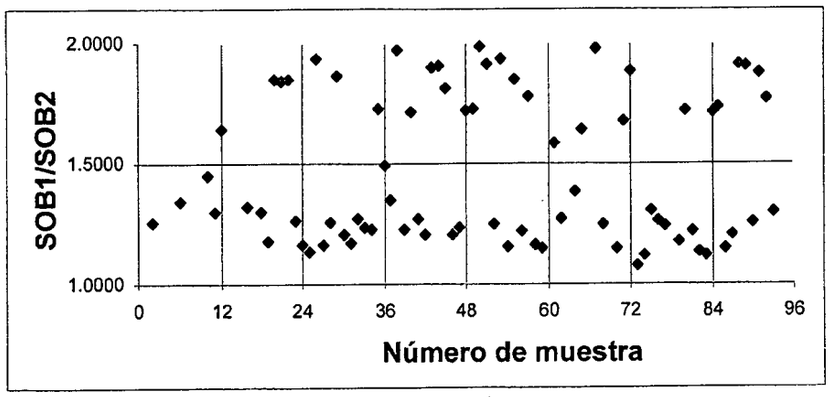


FIG. 4 B

PoCry1F_NK603



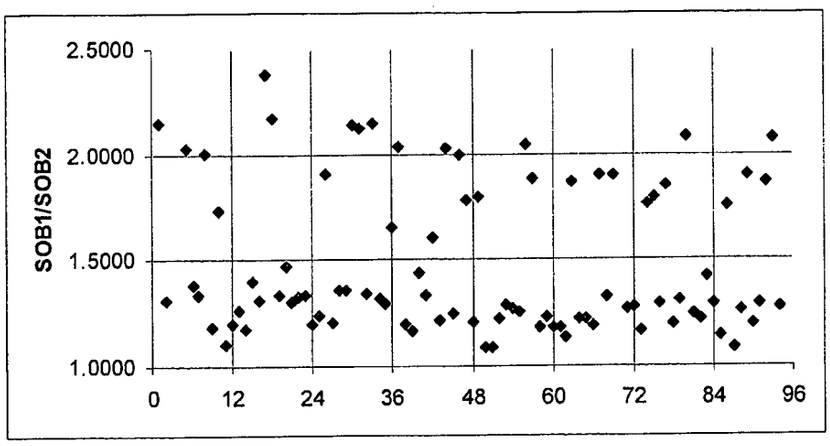


FIG. 4 C

6228 83

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

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

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

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Dow AgroSciences LLC
of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America,

por el presente ratificamos la _____
presentada por _____
como agente oficioso ante _____
en _____
el _____

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

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

hereby ratify the _____
filed without a Power of Attorney by _____
before _____
in _____
on _____

and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we 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 Court, 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, 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

CONSULADO GENERAL

A la vuelta ⟶

Over ⟶

Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

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

No. 254 Chicago, FEB 20 1998

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

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

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US$56.oo (Cincuenta y seis dólares)

CARLOS ALFONSO NEGRETE MONTERA
Cónsul General

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

SF 26

UNITED STATES OF AMERICA

CERTIFICATE OF OFFICE

STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That, according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County and that the term of said office included the date of February 6, 1998: that to all his/her official acts as said official, full faith and credit ought to be given in all Courts of Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana, at Indianapolis, this Tenth day of February, 19.98

SEAL OF THE STATE OF INDIANA 1816

Sue Anne Gilroy
Secretary of State

CHICAGO

by: Mary Reever
Deputy

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

221220

...TA FIRMA APARECE EN EL ...UMENTO DESEMPEÑA ...UNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 A 11: 55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

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

85

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98

ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA

compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

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

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98

before me, a Notary Public of State of Indiana.

personally appeared Kenneth L. Loertscher

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

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98

compareció(eron) ante mí

KENNETH L. LOERTSCHER

quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía

denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT, 1991
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente

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

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

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

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

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

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98

appeared before me

Kenneth L. Loertscher

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

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1991
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC is a ~~Corporation/Company~~ Limited Liability Company legally constituted and in existence

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

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

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned ~~Corporation/Company~~ limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher Assistant Secretary and General Patent Counsel

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

Notario Público — Notary Public

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

*Documents must be identified with date and origin

CERTIFICACION NOTARIAL Y AUTENTICACION CONSULAR

1. Es necesaria la legalización con certificado notarial. El Notario Público debe certificar:

1.1. Que la compañía está legalmente constituída y actualmente existente.

1.2. Su domicilio.

1.3. Que el propósito del poder está incluído en el objeto social de la compañía.

Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.

2. Los documentos que hay que mostrarle al Notario Público para probar los puntos anteriores, deben estar expresados en el Certificado Notarial con fecha y origen:

2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y

2.2. Para el punto 1.4 sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.

Enseguida el Señor Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

NOTARIAL CERTIFICATION AND CONSULAR AUTENTIFICATION

1. Notarial legalization is necessary. The Notary Public must certify:

1.1. That the company is legally constituted and presently existent.

1.2. Its place of business.

1.3. That the purpose of the Power-of-Attorney is included in the activities of the company.

1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Attorney in the name of the company he represents.

2. The documents which the Notary Public had before him to prove the above points must be listed by him in the Notarial Certificate with dated and origin:

2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of execution.

2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Attorney has been authorized to give it.

3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según el artículo 259 del C. de P.C. el Señor Cónsul debe autenticar la última precedente autenticación.

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

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

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

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

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

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

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público

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

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

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

ESTADO UNIDOS DE AMERICA

CERTIFICADO DEL CARGO

ESTADO DE INDIANA

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

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy
Secretario de Estado

(Firmado), Por: Mary Reever
Suplente

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

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

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

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

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

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

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

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

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

_____ IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

_____ ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998

CODEN JUNTA CRITICA

COLOMBIA
Medina
Notario Sexto
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

022686

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER
ABOGADOS

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

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

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

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **DOW AGROSCIENCES LLC**

Poder conferido el : 06/02/1998

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

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

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO 22 OCT 2009

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, D.C.

Compareció(eron) Emilio Ferrero Williamson y Luz Clemencia Suárez de Páez

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

CC 2380119 TP 31929

CC 35415634 TP 23555

Y declaró(eron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero

Luz Clemencia Suárez

REPÚBLICA DE COLOMBIA

Amparo Quintero Arturo

NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, made effective as of the 18th day of December, 2009, by Wei Chen; Wesley Marchione; Stephen Novak; Manju Gupta; Thomas W. Greene; and Siva Kumptla (hereinafter referred to as Assignors), residing at 13232 Tanzanite Circle, Carmel, 46033; 1802 Willowview Court, Greenfield, Indiana 46140; 509 Viburnum Run, Westfield, Indiana 46074; 13463 Winamac Court, Carmel, Indiana; 4668 St. John Circle, Zionsville, Indiana 46077; and 14524 Baldwin Lane, Carmel, Indiana 46032, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in ENDPOINT TAQMAN METHODS FOR DETERMINING ZYGOSITY OF CORN COMPRISING TC1507 EVENTS, set forth in a Patent application for Letters Patent of the United States, already filed on December 18, 2009 as U.S. Application No. 12/642,352; and

WHEREAS, Dow AgroSciences LLC, a Limited Liability Company organized under and pursuant to the laws of Delaware having its principal place of business at 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268-1054 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other good and sufficient consideration,, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefor and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be

granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Patent application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply

with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

Dow AgroSciences LLC

All practitioners at Customer Number 25212

AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

Chen Wei
Wei Chen

Date: 2/5/2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Wei Chen, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman

Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

68533-US-NP

Wesley A Marchione
Wesley Marchione

Date: 2-5-2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Wesley Marchione, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman
Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

Stephen Novak

Stephen Novak

Date: Feb 5, 2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Stephen Novak, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

68533-US-NP

Manju Gupta

Date: 2-5-2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Manju Gupta, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

68533-US-NP

Thomas W. Greene

Date: 2-5-2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Thomas W. Greene, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

68533-US-NP

Siva Kumptla

Date: 2/5/2010

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of February, 2010, before me personally came Siva Kumptla, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Dena H. Tuchman, Notary Public
State of Indiana, Marion County
My Commission Expires November 02, 2012

CESION POR LOS INVENTORES

ESTA CESIÓN, vigente desde el día 18 de Diciembre de 2009, por Wei Chen; Wesley Marchione; Stephen Novak; Manju Gupta; Thomas W. Greene; y Siva Kumptla (en adelante denominados como los Cedentes), residentes en 13232 Tanzanite Circle, Carmel 46033; 1802 Willowview Court, Greenfield, Indiana 46140; 509 Viburnum Run, Westfield, Indiana 46074; 13463 Winamac Court, Carmel, Indiana; 4668 St. John Circle, Zionville, Indiana 46077; y 14524 Baldwin Lane, Carmel, Indiana 46032, respectivamente;

POR CUANTO, los Cedentes han inventado ciertas mejoras nuevas y útiles en METODOS DE VARIABLE DE VALORACIÓN TAQMAN PARA DETERMINAR LA CIGOCIDAD DEL MAIZ COMPRENDIENDO EVENTOS TC1507, establecida en una Solicitud de Patente para Certificado de Patente de los Estados Unidos, ya presentada el 18 de Diciembre de 2009 como Solicitud de los Estados Unidos No.12/642,352; y

POR CUANTO, Dow AgroSciences LLC, una Compañía de Responsabilidad Limitada organizada de conformidad con las leyes de Delaware con lugar principal de negocios en 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268-1054 (en adelante denominada como el Cesionario), tiene el deseo de adquirir el completo derecho, tirulo e interés en y para la mencionada invención y la mencionada Solicitud para Certificado de patente de los Estados Unidos, y en cualquier y para cualquier Certificado de patente de los Estados Unidos a ser obtenido en adelante o en el futuro.

AHORA, por una buena y valorable contraprestación y/o remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/o otra buena y suficiente contraprestación, cuyo recibo por el presente se reconoce, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y enajenado, y por el presente venden, ceden, transfieren y enajenan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, el completo derecho, titulo e interés en y para las invenciones antes mencionadas y solicitud de patentes, y en y para cualesquiera y todas las divisiones, continuaciones y continuaciones en parte directas o indirectas para tales solicitudes, y cualesquiera y todos los Certificados de patente en los Estados Unidos y en todos los países extranjeros en los cuales se puedan otorgar sobre ella y en relación con ella, y re-expediciones, re-exámenes y prorrogas de tales Certificados de Patente, y todos los derechos bajo la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, siendo los mismos disfrutados por el cesionario, para su propio uso y beneficio y par el uso y beneficio de sus sucesores, representantes legales y cesionarios, hasta finalizar el término o términos para los cuales tales Certificados de patente fueron concedidos y/o prorrogados, como íntegramente y completamente los mismos hubieran sido disfrutados por el Cedente, si esta venta o cesión no se hubiere llevado a cabo.

Y por la misma contraprestación, los Cedentes por el presente declaran y garantizan al Cesionario, a sus sucesores, representantes legales y cesionarios, que al momento de la suscripción y entrega del presente, excepto por cualesquiera derechos, títulos y/o intereses que hubieren surgido para el Cesionario bajo la ley o que ya se hubieren transferido al Cesionario, los Cedentes son los únicos propietarios bajo la ley del completo derecho, titulo e interés en y para las mencionadas invenciones y solicitud de Certificado de patente antes mencionadas, y que las mismas no se encuentran gravadas y que los Cedentes tienen el derecho bueno e integro y la capacidad legal para vender el mismo de la manera aquí establecida.

Y por la misma contraprestación, los Cedentes por el presente se comprometen y acuerdan para y con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios a que los Cedentes firmarán todos los papeles y documentos, tomaran todos los juramentos y realizarán todos los actos necesarios o requeridos para llevarse a cabo para la obtención, mantenimiento, cumplimiento y defensa de cualesquiera Certificados de Patente y solicitudes para certificados de patente para tales invenciones, sin cargo para el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios cuando así lo asesore el asesor del cesionario, o asesor de sus sucesores, representantes legales o cesionarios; que cualesquiera procesos en relación con cualesquiera Certificados de Patente o solicitudes para certificados de patente para dichas invenciones en cualquier país, incluyendo sin limitación, procesos de interferencia, es legal y deseable; o que cualquier división, continuación

o continuación en parte para cualquier solicitud para certificado de patente, o cualquier reexpedición, re-examen o prorroga de cualesquiera certificados de Patente a ser obtenidas sobre ella, es legal y deseable.

Y los cedentes por el presente solicitan al Comisionado de Patentes y marcas expedir tales Certificados de Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como el Cesionario de tales invenciones y los certificados de patente a ser expedidos en adelante, para el único uso y beneficio del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y los cesionarios por el presente otorgan a los siguientes individuos la facultad para insertar en esta Cesión cualquier identificación adicional que pueda ser necesaria o deseable para cumplir con las reglas de la oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos par el registro de este documento:

Dow AgroSciences LLC

Todos los Practicantes en el Número de Cliente 25212

Y los cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al cesionario al momento en la que la invención fue realizada.

(Firmado)
Wei Chen

Fecha 2/5/2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Wei Chen, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)
Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

(Firmado)
Wesley Marchione

Fecha 2/5/2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Wesley Marchione, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)

Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

(Firmado)
Stephen Novak

Fecha Febrero 5, 2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Stephen Novak, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)
Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

(Firmado)
Manju Gupta

Fecha 2/5/2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Manju Gupta, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)
Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

(Firmado)
Thomas W. Greene

Fecha 2/5/2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Thomas W. Greene, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)
Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

(Firmado)
Siva Kumptla

Fecha 2/5/2010

Estados Unidos de América
Estado de Indiana
Condado de Marion

En este día 5 de Febrero de 2010, ante mi personalmente compareció Siva Kumptla, a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior y reconoció la suscripción del mismo.

(Firmado)
Dena H. Tuchman, Notario Público, Estado de Indiana, Condado de Marion Mi Comisión expira el 2 de Noviembre de 2012.

98

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0071475

Bogotá D.C., Julio 13 de 2012 - 13:11:36

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446258680	13/07/2012	51.725.000.00

*** Conceptos Pagados ***

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

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

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-121231- -00000-0000
Fecha: 2012-07-18 16:51:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

CO10:10975-841-114-3

99

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0073241

Bogotá D.C., Julio 18 de 2012 - 16:37:53

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	57983	12/06/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	67182	04/07/2012		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	71425	13/07/2012		310.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
12	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	360.000.00
				$360.000.00

SON: **TRESCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-121231- -00000-0000
Fecha: 2012-07-18 16:51:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD FASE NACIONAL PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** **12/642,352** (32) ***Fecha*** **2009/12/18** (33) ***País*** **US**

(51) Int Cl: **C12P 019/034**

(71)Solicitante(s) **DOW AGROSCIENCES LLC**

(72) Inventor(es) **WEI CHEN Y OTROS**

(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2012/07/18
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 2010/12/17
No. de solicitud PCT/US2010/061036

(87) Publicación internacional
Fecha: 2011/06/23
N° publicación: ***WO 2011/075648 A1***

(54) Titulo: **MÉTODOS TAQMAN DE PUNTO FINAL PARA DETERMINAR CIGOCIDAD DE MAÍZ QUE COMPRENDE EVENTOS TC1507**

Resumen:

Se da a conocer un método para el análisis de cigosidad del evento TC1507 del maíz Cry1F. El método produce cebadores específicos para el evento TC1507 y cebadores específicos para el gen de referencia y combinaciones de sondas TaqMan para usar en un ensayo de PCR TaqMan biplex de punto final con capacidad para producir hallazgos de genotipos fuertes para asistir en la reproducción molecular de TC1507.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-121231- -00000-0000

Fecha: 2012-07-18 16:51:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTIL

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐