

of



# Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT  
SOLICITUD

## PATENTE DE INVENCION

06-95570

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

Fruto de Maíz MIR604

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

ADH 5/00

71. SOLICITANTE

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

DOMICILIO

BASEL, SUIZA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C., Septiembre 22-2006

Ceja, Anexo 3  
p. 26-10-2006

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

**SOLICITUD DE:**

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**

Nombre: **Syngenta Participations AG.**  
Dirección: **Schwarzwaldallee 215, CH-4058  
Basilea**

Nacionalidad o Domicilio: **Basilea, Suiza**  
Lugar de Constitución : **Suiza**  
Teléfono: Fax:  
E-mail

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO  
(74)**

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**  
Dirección: **Cra. 11A No. 94-78 (Of. 305)**  
Teléfono: **6 162051/61** Fax: **6 161889**  
E-mail: **tm-patent@escobaruribe.com**

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número **39.779.452 T.P.68.228**

4

**INVENTOR (ES)  
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**  
Dirección:  
Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/004790 Fecha 16 de febrero de 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/103301 A3 Fecha 3 de noviembre de 2005

6 **TÍTULO (54)** Evento de Maíz MIR604

7 **Clasificación Internacional (51)** A01H 5/00

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

25 de marzo de 2004

(31) Número de Solicitud

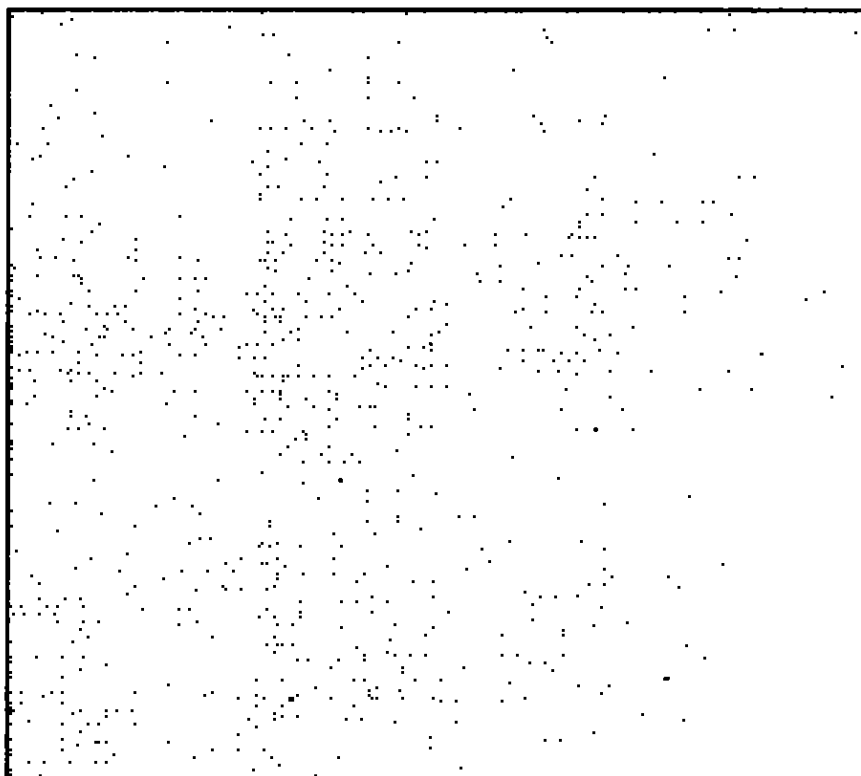
60/556,260

9 **Comprobante de pago No.** 06 - 64.517

**Fecha** 23 de agosto de 2006

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros "Opinión escrita".

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA



## 12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar*

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.228

2997/PCT

2797

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 64,517  
FECHA : AGOSTO 23 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 06-095570- -00000-0000  
Fee: 2006-08-22 14:33:05 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTENYII  
Eve: 379 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 156

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE             | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PAGO | Vr. PAGO      |
|-------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|---------------|
| ESCOBAR URIBE ASOCIADOS | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 48145376 | 23/08/2006 | 11,437,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                       |                |
| 1     |             | TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 463,000.       |
|       |             | TOTAL :                           | \$ 463,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

## **ANEXOS**

### **INVENTORES**

- 1.) **STEINER, Henry-York**  
( 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, Carolina del Norte 27709, Estados Unidos de América );
- 2.) **CHEN, Eric**  
( Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, Carolina del Norte 27709, Estados Unidos de América);
- 3.) **MEGHIJI, Moez**  
( Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, Carolina del Norte 27709, Estados Unidos de América).

B  
4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad  
**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG**, sociedad  
constituida de conformidad con las leyes de Suiza,  
domiciliada en Schwarzwaldallee 215, CH-4058  
Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente para la  
invención titulada "**Evento de Maíz MIR604**".

Clase: A01H 5/00

  
**JIMENA ESCOBAR-URIBE**  
C.C. 39.779.452 de Usaquen.  
T.P. 68.228

# GENERAL POWER OF ATTORNEY DOCUMENTO DE PODER

El suscrito

obrando en nombre y representación de  
SYNGENTA PARTICIPATIONS  
AG,  
constituida y organizada según las leyes de  
Suiza.

con domicilio en Basilea, Suiza

nombre a  
JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO  
ESCOBAR-URIBE

domiciliados en Bogotá, Colombia  
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

acting on behalf of and representing  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, a company  
incorporated under the law of Switzerland

domiciled at Basel, Switzerland

hereby appoints  
JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO  
ESCOBAR-URIBE

domiciled at Bogotá, Colombia  
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial designs and names, trademarks, domain names, copyrights and neighbourhood rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiff or defendant, in any instance for appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial usages and names; oppositions against trademark registrations, caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtaining and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbourhood rights and obtaining of plant varieties' rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, divisions, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and fees as provided by law; to write or obtain granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective refusals and, in general to take, before said authorities, pertinent steps to the above-mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal facilities, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed at  
Basel, Switzerland  
February 7, 2001

Syngenta Participations AG

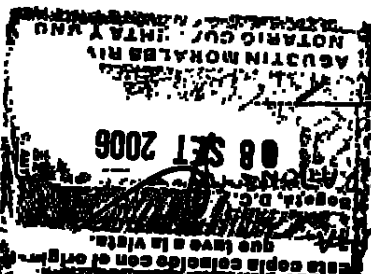
Mike Dammann  
Annette Wanner  
Trademark Specialist Application Specialist

apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, nombres de dominio, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseñas, registros sanitarios, así como sus trasposos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualquier clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como: acciones derivadas del nombre o enseña comercial; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de compensación de daños; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicio, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtención de variedades vegetales.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescriptos por la ley; renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en Basilea, Suiza  
el 7 febrero, 2001  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG



## LEGALIZATION

I, the undersigned Notary Public, residing in Basle (Switzerland), certify as true and authentic the signatures applied on the back of this document by Messrs. Mike Dammann, German citizen, residing in Eimeldingen (Germany), and Mrs. Annette Wanner, French citizen, residing in Wentzwiller (France).

These two persons are authorized to represent, the first as Trademark Specialist, the second as Application Specialist the Syngenta Participations AG, a company limited by shares legally domiciled in Basle, with their joint signature by two according to a special power of attorney.

I know the named and their signatures personally.

Basle, this 1<sup>st</sup> (fourteenth) day of February 2001 (two thousand-one).

Leg. Prot. Nr. 855/2001

### Legalization

We hereby certify that the signature of Mr.

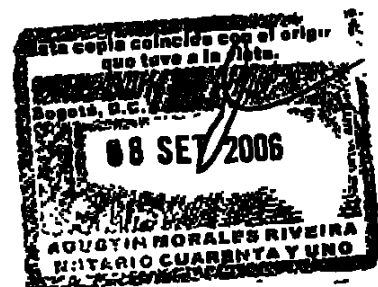
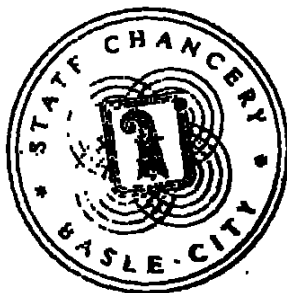
*D. im. C. F. 1006*  
notary public in Basle (Switzerland), who is personally known to us, is genuine.

Basle, 15. Feb. 2001

No.

2'64f

State Chancery of the  
Canton of Basle-City





*Consulado de Colombia*

*Berna*



AUTENTICACION DE FIRMA No. 0233

BERNA, 15 DE FEBRERO DEL 2001

El Suscrito Segundo Secretario Encargado  
de las funciones consulares de la embajada de la república de  
Colombia

CERTIFICA

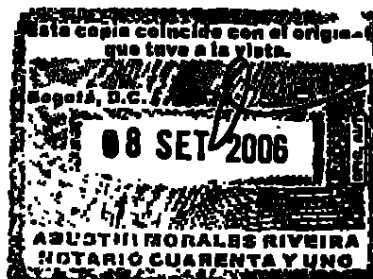
Que la señora **HEIDI FISCHER**, que autoriza el presente documento, ejercía legalmente en la fecha expresada, las funciones de Oficial de la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este Consulado.

El Suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares de la Embajada, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento autenticado.

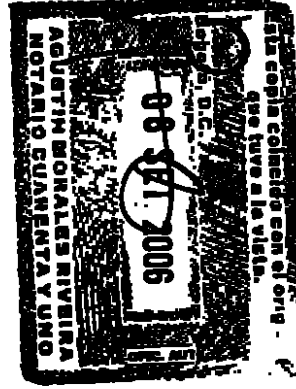


*Ignacio Arbeláez M.*

- Pagado Impuesto de Timbre: U\$ 7.00
- Pagado Derechos Consulares: U\$ 15.00



**JIMENA ESCOBAR URIBE**  
Traductor e Interpretador Oficial  
Matrícula No. 0369 Min. Justicia 1995



121  
CINCO DEFECCIONES  
EXCEPCIONES  
y b e l u e z  
11 1 6 4 5 9

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD POR TEXTO "a"

2608 MAR -8 *WJ*

JEFE DE LEGALIZACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CUYA FIRMA AUTORIZA EN EL  
DOCUMENTO DESEMPLEA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

F  
8

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento que lleva el sello de legalización No. 416459 de marzo 8 de 2001 y firmado por el Jefe de Legalizaciones en Santafé de Bogotá D.C. (firma ilegible), el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, constituida y organizada según las leyes de Suiza, domiciliada en Basilea, Suiza a Jimena Escobar-Uribe y/o Ignacio Escobar-Uribe y firmado en Basilea, Suiza el 7 de febrero de 2001 por Mike Dammann, Especialista en Marcas y por Annette Wanner, Especialista en Solicitudes.

-----

**LEGALIZACIÓN**

Yo, el suscrito Notario Público, residente en Basilea (Suiza), certifico como verdaderas y auténticas las firmas inscritas en el reverso de este documento por los señores Mike Dammann, ciudadana alemán, residente en Eimeldingen (Alemania) y la señora Annette Wanner, ciudadana francesa, residente en Wentzwiller (Francia).

Estas dos personas están autorizadas para representar, el primero como Especialista de Marcas, la segunda como Especialista de Solicitudes, a Syngenta Participations AG, una sociedad limitada por acciones legalmente domiciliada en Basilea, con su firma conjunta por dos de acuerdo con un poder especial.

Conozco a las nombradas y a sus firmas personalmente.

Basilea, este 14 (decimocuarto) día de febrero de 2001 (dos mil uno).

(fdo) Firma ilegible  
Sello oficial notarial  
Conrad Haab I.U.D.  
Leg. Prot. 655/2001

Legalización (Sello)

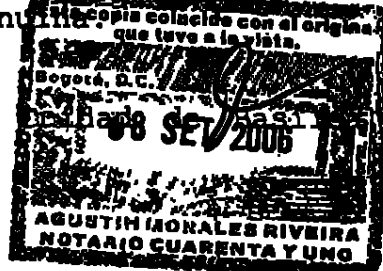
Por medio del presente certificamos que la firma del señor (ilegible) notario público en Basilea (Suiza), quien es personalmente conocido por nosotros, es genuina. que tuvo a la vista.

Basilea, 15 de febrero de 2001

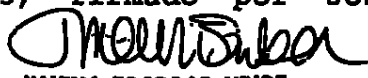
No. 2'648

Cancillería de Estado del Cantón de la Basilea (sello oficial)

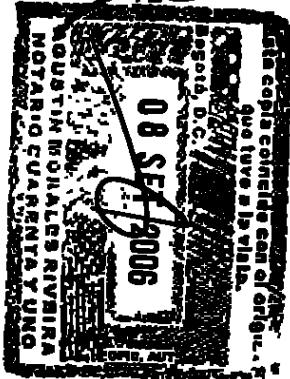
(fdo) Heidi Fischer



La firma y sello precedentes fueron autenticados por el Consulado de Colombia en Berna, Suiza, el día 15 de febrero de 2001, bajo el número 0233, firmado por José Ignacio Arbeláez M.

  
**JIMENA ESCOBAR URIBE**

Traductor e Intérprete Oficial  
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



*inven*  
*416533*

08 SEP 2006

416533

CUYA  
DOCUMENTOS  
LAS

NO SE ASO DE  
2500-97-0017-001-1570

2001 MAR -8 11:12

*Miguel*  
JEFE DE LEONARDO  
SANTANA DE MONTA R.C.

8  
9

|                                                                                                                                          |                                      |                                                                                                                                                                             |                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|  <b>Industria y Comercio</b><br><b>SUPERINTENDENCIA</b> |                                      | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |                     |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                    |                                      | (51) Int Cl: <b>A01H 5/00</b>                                                                                                                                               |                     |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                                                                  |                                      | (71) Solicitante(s) <b>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG</b>                                                                                                                       |                     |
| (30) Prioridad Estadinense                                                                                                               | (31) No. Prioridad <b>60/556,260</b> | 32) Fecha <b>25/03/04</b>                                                                                                                                                   | (33) País <b>US</b> |
|                                                                                                                                          |                                      | (72) Inventor(es) <b>STEINER, Henry-York //</b><br><b>CHEN, Eric //</b><br><b>MEGHJI, Moez.</b>                                                                             |                     |
|                                                                                                                                          |                                      | (74) Agente: <b>JIMENA ESCOBAR URIBE</b>                                                                                                                                    |                     |
| (85) Fecha inicio fase nacional:                                                                                                         |                                      | (87) Publicación internacional                                                                                                                                              |                     |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                               |                                      | Fecha: <b>Fecha (dd/mm/aa) 03/11/05</b>                                                                                                                                     |                     |
| Fecha de presentación de la solicitud: <b>Fecha 16/02/05</b>                                                                             |                                      | N° publicación: <b>WO 2005/103301 A3</b>                                                                                                                                    |                     |
| No. de solicitud <b>PCT/US2005/004790</b>                                                                                                |                                      |                                                                                                                                                                             |                     |
| (54) Título: <b>Evento de Maíz MIR604</b>                                                                                                |                                      |                                                                                                                                                                             |                     |

Reivindicación(es):

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una secuencia de nucleótido de unión del MIR604 de evento de maíz seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1 la SEC ID NO: 2, y complementos de estos.
6. Un ácido nucleico aislado que enlaza una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el MIR604 de evento de maíz que comprende una secuencia de aproximadamente 11 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1 SEC ID NO: y complementos de estos.
7. Un amplímero que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una secuencia de iniciador de polinucleótido para detectar ADN de MIR604 de evento de maíz en una muestra que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 1-601 como se establece en la SEC ID NO: 3, o los complementos de esta.
10. Un iniciador de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 507-1570 como se establece en la SEC ID NO: 4, o los complementos de estos.
12. Un par de iniciadores de polinucleótido que comprenden un primer iniciador de polinucleótido y un segundo iniciador de polinucleótido que funcionan juntos en la presencia de una plantilla de ADN MIR604 de evento de maíz en una muestra para producir un diagnóstico de amplímero para el MIR604 de evento de maíz, en donde la primer secuencia iniciadora es o se complementa con un genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del MIR604 de evento de maíz, y la segunda secuencia de iniciador de polinucleótido es o se complementa con la secuencia de ADN heteróloga honestada en el genoma de planta de maíz en el MIR604 de evento de maíz.

A  
10**Resumen:**

Se describe un evento de maíz transgénico novedoso designado MIR604. La invención se relaciona con secuencias de ADN de construcciones recombinantes insertadas dentro del genoma y de secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción que resulta en el evento MIR604, para las plantas de maíz y semillas de maíz que comprenden el genotipo MIR604 y los métodos para producir una planta de maíz al cruzar una planta de maíz que comprende el genotipo MIR604 consigo mismo o con otra variedad.

**Evento de Maíz MIR604****CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se relaciona de manera general con el campo de la biología molecular vegetal, la transformación de plantas, y el cultivo de plantas. Más específicamente, la invención se relaciona con plantas de maíz transgénicas resistentes a insectos que comprenden un genotipo transgénico y novedoso y métodos para detectar la presencia del ADN de la planta de maíz en una muestra y composiciones de éstas.

**ANTECEDENTES**

[0002] Las plagas vegetales son el principal factor en la pérdida de los cultivos agrícolas importantes del mundo. Aproximadamente 8 billones se pierden cada año en los estados unidos solamente debido a las infestaciones de insectos que incluyen plagas de no mamíferos. Las especies de gusano de raíz del maíz son consideradas las plagas más destructoras del maíz. Las especies de plagas de gusano de raíz importantes incluyen *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de raíz del maíz occidental; *D. Longicornis barberi*, gusano de raíz de maíz del norte, *D. undecimpunctata howardi*, gusano de raíz de maíz del sur, y *D. virgifera zea*, gusano de raíz del maíz de México.

H  
12

[0003] El gusano de raíz del maíz es controlado principalmente mediante aplicaciones intensivas de pesticidas químicos. Un buen control del gusano de raíz del maíz se puede así alcanzar, pero estos químicos pueden algunas veces también afectar los organismos benéficos. Otro problema que resulta del uso amplio de pesticidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Esto se ha aliviado parcialmente mediante varias prácticas de manejo de la resistencia, pero existe creciente necesidad por estrategias alternativas de control de plagas. Una de tales alternativas incluye la expresión de genes extraños que codifican proteínas insecticidas en plantas transgénicas. Esta aproximación ha suministrado unos medios eficientes de protección contra las plagas de insectos seleccionadas, y las plantas transgénicas que expresan toxinas insecticidas se han comercializado, permitiéndole a los agricultores reducir la aplicación de insecticidas químicos.

[0004] La expresión de genes extraños en las plantas se puede influenciar por su posición cromosómica, quizás debido a la estructura de la cromatina y la o la proximidad de los elementos de regulación transcripcional cerca al sitio de integración (Ver por ejemplo, Weising et al, 1988, "Foreign Genes in Plants," Ann. Rev. Genet. 22: 421-477). Por lo tanto, es como un producir cientos de diferentes eventos y seleccionar aquellos eventos para un evento simple que tienen

12  
13

los niveles de expresión transgénica deseados y los patrones para los propósitos comerciales. Un evento que tiene los niveles deseados o los patrones de expresión transgénica es útil para introducir el transgen en otros antecedentes genéticos mediante cruce externo sexual utilizando métodos de cultivo convencionales. La progenie de tales cruces mantiene las características de expresión del transgen del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar la expresión genética confiable en un número de variedades que son inadaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

[0005] Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie del cruce sexual contiene un transgen de interés además, un método para detectar un evento particular sería útil para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación premercadeo y la marcación de los alimentos derivados de plantas de cultivo recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgen mediante cualquier método de detección de ácido nucleico bien conocido que incluye pero no está limitado a la amplificación térmica (reacción de cadena de polimerasa (PCR)) utilizando iniciadores de polinucleótido o hibridización de ADN que utiliza sondas de ácido nucleico. Típicamente, por motivos de simplicidad y uniformidad de los reactivos y las metodologías para uso en la detección de una construcción de ADN

13  
14

particular que ha sido utilizada para transformar varias variedades de plantas, éstos métodos de detección generalmente se enfocan en elementos genéticos frecuentemente utilizados, por ejemplo, promotores, terminadores, y genes marcadores, por que para muchas construcciones de ADN, la región de secuencia de codificación es intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre las construcciones que difieren solamente con referencia a la secuencia de codificación. Además, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos utilizando la misma construcción de ADN a menos que la secuencia de ADN cromosómica adyacente al ADN heterólogo insertado sea conocida ("ADN de flaqueo").

[0006] La presente invención incluye un evento de maíz transgénico resistente a insecto que se ha incorporado en su genoma como un gen *cry3A055*, descrito en la Publicación Internacional No. WO 03/018810, publicada en Marzo 3, 20006, que se incorpora aquí como referencia, que codifica una toxina insecticida *Cry3A055*, útil para controlar plagas de insectos *Diabrotica spp.* El evento de maíz transgénico también ha incorporado en su genoma un gen *pmi*, que codifica una enzima de isomerasa fosfomanosa (PMI), descrita en la patente US No. 5,767,378, que se incorpora aquí como referencia, útil como un marcador seleccionable, que le permite a la planta utilizar manosa como una fuente de carbón. La presente

14  
15

invención incluye además secuencias de ácido nucleico aisladas novedosas las cuales son únicas al evento de maíz transgénico, útiles para identificar el evento de maíz transgénico y para detectar los ácidos nucleicos provenientes del evento de maíz transgénico en una muestra biológica, así como también kits que comprenden los reactivos necesarios para uso en detectar estos ácidos nucleicos en una muestra biológica.

#### RESUMEN

[0007] La presente invención está dirigida a un evento de maíz transgénico, designado MIR604, que comprende un genotipo transgénico novedoso que comprende un gen *cry3A055* y un gen *pmi* que confiere resistencia a los insectos y la capacidad de utilizar manosa como una fuente de carbón, respectivamente, al evento de maíz MIR604 y a la progenie de ésta. La invención también suministra plantas de maíz transgénico que comprenden el genotipo de la invención, semillas de maíz de plantas de maíz transgénico que comprenden el genotipo de la invención y a métodos para producir una planta de maíz transgénico que comprende el genotipo de la invención al cruzar un endógeno de maíz que comprende el genotipo de la invención con si mismo u otra línea de maíz de un genotipo diferente. Las plantas de maíz transgénico de la invención pueden ser esencialmente todas las de características morfológicas y fisiológicas que la correspondiente planta de

15  
16

maíz no transgénica isogénica además de aquellas conferidas por la planta de maíz mediante genotipo novedoso de la invención. La presente invención también suministra composiciones y métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos del evento MIR604 con base en la secuencia de ADN de los casetes de expresión recombinantes insertados en el genoma de maíz que resulta en el evento MIR604 y de las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. El evento MIR604 se puede caracterizar además por analizar los niveles de expresión del cry3A055 y las proteínas PMI así como también por la eficacia de ensayo contra el gusano de raíz del maíz.

[0008] De acuerdo con un aspecto, la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604 y al menos 10 nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con un aspecto puede comprender al menos 20 o al menos 50 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604 y al menos 20 o al menos 50 nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de la planta de maíz que flanquea el punto de

12  
17

inserción de la secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604.

[009] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido que comprende al menos una secuencia de unión del evento MIR604 seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 y complementos de éstas. Una secuencia de unión se extiende sobre la unión entre el ADN heterólogo que comprende los casetes de expresión insertados en el genoma del maíz y el ADN proveniente del genoma de maíz que flanquea el sitio de inserción y es diagnóstico para el evento MIR604.

[0010] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención suministra un ácido nucleico aislado que enlaza una molécula de ADN heteróloga al genoma de planta de maíz en el evento de maíz MIR604 que comprende una secuencia de desde aproximadamente 11 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, complementos de ésta.

[0011] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y complementos de ésta.

17  
18

[0012] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministra un amplímero que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

[0013] De acuerdo aún con otro aspecto de la invención, se suministran los iniciadores de la secuencia de flanqueo para detectar el evento MIR604. Tales iniciadores de la secuencia de flanqueo comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1-801 como se establece en la SEQ ID NO: 3 (designada arbitrariamente aquí como la secuencia de flanqueo 5'), o los complementos de ésta. En una modalidad de este aspecto los iniciadores de la secuencia de flanqueo se seleccionan del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y complementos de éste.

[0014] En otro aspecto de la invención, los iniciadores de las secuencias de flanqueo comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende la menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 507-570 como se establece en la SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada aquí como la secuencia de flanqueo 3'), o los complementos de ésta. En una modalidad de éste aspecto los iniciadores de la secuencia de flanqueo se seleccionan del grupo que consiste de la SEQ ID

18  
19

NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, y complementos de esto.

[0015] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministran los pares iniciadores que son útiles para la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo. Tales pares iniciadores comprenden un primer iniciador que comprende una secuencia de nucleótido de al menos 10-15 nucleótidos continuos de longitud que es o es complementaria a una de las secuencias de flanqueo genómica descritas anteriormente (SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4) y un segundo iniciador que comprende una secuencia de nucleótido de a menos 10-15 nucleótidos contiguos del ADN heterólogo insertado en el evento en el genoma MIR604 del evento. El segundo iniciador, preferiblemente comprende una secuencia de nucleótido que es complementaria a la secuencia de inserto adyacente a la secuencia de ADN de flanqueo genómico de la planta como se establece en la SEQ ID NO: 3 proveniente desde la posición de nucleótido 802 a 1310 en la SEQ ID NO: 4 desde la posición de nucleótido 1 a la 506.

[0016] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministran los métodos para detectar la presencia del ADN que corresponden al evento MIR604 en una muestra biológica, Tales métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende al ADN con un par de iniciadores que, cuando se

A  
20

utilizan en una Reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN genómico proveniente del evento de maíz MIR604; produce un amplímero que es diagnóstico para el evento de maíz MIR604; (b) desarrollar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de esta manera el amplímero; y (c) detectar el amplímero. En una modalidad de este aspecto, el amplímero comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4, y complementos de ésta.

[0017] De acuerdo con otro aspecto, la invención suministra métodos para detectar la presencia de un ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica. Todos los métodos comprende (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibridiza bajo altas condiciones de exigencia con el ADN genómico proveniente del evento de maíz MIR604 que no se hibridiza bajo altas condiciones de exigencia con el ADN de una planta de maíz de control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridización de alta exigencia, (c) detectar la hibridización de la sonda al ADN.

[0018] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministra un kit para la supresión de los ácidos nucleicos del evento MIR604 en una muestra biológica. El kit incluye al menos una secuencia de ADN que comprende una longitud

20  
21

suficiente de polinucleótidos que son complementarios a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, en donde las secuencias de ADN son útiles como hibridadores o sondas que hibridizan el ADN aislado del evento MIR604, y los cuales, luego de amplificación o hibridización de una secuencia de ácido nucleico en una muestra seguida por la detención del amplímero o la hibridización de la secuencia blanco, son diagnósticas para la presencia de la secuencia de ácido nucleico del evento MIR 604 de la muestra. Un kit adicional incluye otros materiales necesarios para posibilitar la hibridización de ácido nucleico o los métodos de amplificación.

[0019] En otro aspecto, la presente invención suministra un método para detectar una proteína MIR604 del evento de maíz en una muestra biológica que comprende: (a) extraer proteína de una muestra del tejido MIR604 del evento de maíz; (b) ensayar la proteína extraída utilizando un método inmunológico que comprende un anticuerpo específico para la proteína marcadora insecticida o seleccionable producida por el evento MIR604; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo al insecticida o a la proteína marcadora seleccionable;

[0020] En otro aspecto la presente invención suministra una muestra biológica derivada de una planta de maíz del evento MIR604, tejido, o semilla, en donde la muestra comprende una secuencia de nucleótido que es o es

21  
22

complementaria a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 y de la SEQ ID NO: 2, y en donde la secuencia es detectable en la muestra utilizando una amplificación de ácido nucleico o un método de hibridización de ácido nucleico. En una modalidad de este aspecto, la muestra se selecciona del grupo que consiste de harina de maíz, comida de maíz, melaza de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales elaborados en todo o en parte para contener sus productos de maíz.

[0021] en otro aspecto la presente invención suministra un extracto derivado de una planta de maíz del evento MIR604, tejido, o semilla que comprende una secuencia de nucleótido que es o es complementaria a una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2. En una modalidad de este aspecto la secuencia es detectable en el extracto utilizando un método de amplificación de ácido nucleico o un método de hibridización de ácido nucleico. En otra modalidad de este aspecto la muestra se selecciona del grupo que consiste de harina de maíz, comida de maíz, melaza de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales elaborados en todo o en parte para contener sub. Productos de maíz.

[0022] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministran las plantas y la semillas de maíz que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención.

22  
23

[0023] De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un método para producir una planta de maíz resistente a al menos una infestación de gusano de gusano de raíz de maíz que comprende: (a) cruzar sexualmente una primer planta de maíz padre con una segunda planta de maíz padre en donde, dicha primera o dicha segunda planta de maíz padre comprenden un ADN de evento de maíz MIR604, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de progenie de primera generación; (b) seleccionar una planta progenie de primera generación que es resistente a al menos una infestación de gusano de raíz de maíz; (c) autopolinizar la planta de progenie de primera generación; produciendo de esta manera una pluralidad de plantas progenie de segunda generación (d) seleccionar de las plantas progenie de segunda generación una planta que es al menos resistente a la infestación de gusano de raíz de maíz en donde las plantas de progenie de segunda generación comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2.

[0024] De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un método para producir semillas de maíz que comprende cruzar una primer planta de maíz padre con una segunda planta de maíz padre y cosechar la primer generación resultante de semilla de maíz, en donde la primer o segunda

23  
24

planta de maíz padre es una planta de maíz endógama de la invención.

[0025] De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un método para producir semillas de maíz híbrido que comprende las etapas de: (a) plantar semillas en una primer línea de maíz endógama de acuerdo con la invención y semillas de una segunda línea de maíz endógama que tiene un diferente genotipo; (b) cultivar plantas de maíz que resultan de dicha plantación hasta el momento de florecimiento; (c) emasculas las flores de las plantas de maíz de unas de las líneas endógamas de maíz; (d) permitir que ocurra la polinización de de otra línea endógama, (c) cosechar la semilla híbrida de esta manera.

[0026] Los anteriores y otros aspectos de la invención serán mas evidentes de la siguiente descripción detallada.

#### **DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO DE SECUENCIA**

SEQ ID NO: 1 es la unión del inserto del genoma 5'.

SEQ ID NO: 2 es la unión del genoma inserto 3'.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia del genoma más inserto 5'.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de inserto mas genoma 3'.

SEQ ID NO: 5 es el genoma de maíz que flanquea el 5' al inserto.

24  
25

SEQ ID NO: 6 es el genoma de maíz que flanquea el 3' al inserto.

SEQ ID NO: 7-15 son los iniciadores de secuencia de secuencia de flanqueo 5' útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 16-20 son los iniciadores de secuencia promotora MTL útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 21-28 son los iniciadores de secuencia cry3A055 útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 29-30 son iniciadores de secuencia ZmUbiInt útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 31-37 son iniciadores de secuencia pmi útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 38 es un iniciador de secuencia NOS útil en la presente invención.

SEQ ID NO: 39-46 son iniciadores de secuencia de flanqueo 3' útiles en la presente invención.

SEQ ID NO: 47-49 son los iniciadores cry3 A055 TAQMAN y la sonda

SEQ ID NO: 50-52 son iniciadores y sonda pmi TAQMAN

SEQ ID NO: 53-55 son los iniciadores y sonda ZmADH TAQMAN.

SEQ ID NO: 56 es una sonda MIR604 útil en la presente invención.

SEQ ID NO: 57 es la secuencia para la región límite derecha.

SEQ ID NO: 58 es la secuencia para el promotor MTL

SEQ ID NO: 59 es la secuencia del Gen cry3A055.

SEQ ID NO: 60 es la secuencia del terminador NOS.

SEQ ID NO: 61 es la secuencia del promotor ZmUbiInt.

25  
26

SEQ ID NO: 62 es la secuencia del Gen *pmi*.

SEQ ID NO: 63 es la secuencia de la región límite izquierda.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra un vector de expresión de planta designado pZM26. El mapa identifica el sitio de restricción *XpnI* utilizado para el análisis Southern.

La figura 2 es un mapa grafico que ilustra la organización de los elementos que comprende la secuencia de ácido nucleico heterólogo insertado en el genoma del evento de maíz MIR604 y establece las posiciones relativas en las cuales las secuencias de ácido nucleico insertados están ligadas a las secuencias de ADN geonómico de maíz que flanquean los extremos de las secuencias de ADN heteróloga insertados. 1=genoma de planta de flanco 5' (SEQ ID NO: 5); 2=región límite derecha (SEQ ID NO: 57); 3=promotor MTL (SEQ ID NO: 58); 4= Gen *cry3A055* (SEQ ID NO: 59); 5= terminador NOS (SEQ ID NO: 60); 6= promotor *zMUBINT* (SEQ ID NO: 61); 7= Gen *pmi* (SEQ ID NO: 62); 8= terminador NOS (SEQ ID NO: 60); 9 = región límite izquierda (SEQ ID NO: 63); y 10 = genoma de planta de flanco de 3' (SEQ ID NO: 6).

26  
27DEFINICIONES

[0027] Las siguientes definiciones y métodos se suministran para definir mejor la presente invención y para guiar aquellos expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se anote otra cosa como los términos utilizados aquí se debe entender de acuerdo al uso convencional de aquellos expertos en la técnica. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Riegger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5<sup>th</sup> edición Springer-Verlag: New York, 1994.

[0028] Como se utiliza aquí el termino "amplificado" significa la construcción de copias múltiples de una molécula de ácido nucleico o copias múltiples complementarias a la molécula de ácido nucleico que utiliza al menos una de las moléculas de ácido nucleico como un molde. Los sistemas de amplificación incluyen los sistemas de reacción de cadena polimerasa (PCR), los sistemas de reacción de cadena de ligasa (LCR), la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario) los sistemas de replicasa Q-Beta, el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), y la amplificación de desplazamiento de hebra (SDA). Ver, por ejemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D.H. Persing et al., Ed American Society for Microbiology, Washington, D.C

27  
28

(1993). El producto de la amplificación es denominada un amplímero.

[0029] Una secuencia de codificación "es una secuencia de ácido nucleico que es transcrita en el ARN tal como el mRNA, el rARN, tARN, snARN, ARN con sentido o ARN sin sentido o contra sentido, preferiblemente el ARN es traducido en un organismo para producir una proteína.

[0030] El "Kit de Detección" como se utiliza aquí se refiere a un kit utilizado para detectar la presencia o ausencia de ADN proveniente de plantas MIR604 en una muestra que comprende sondas e iniciadores de ácido nucleico de la presente invención que hibridiza específicamente bajo condiciones de exigencia altas a una secuencia de ADN blanco y otros materiales necesarios para posibilitar la hibridización de ácido nucleico por los métodos de amplificación.

[0031] Como se utiliza aquí el término "evento" transgénico se refiere a una planta recombinante producida por la transformación y regeneración de una célula vegetal simple con ADN heterólogo, por ejemplo, un casete de expresión que incluye un gen de interés. El término "evento" se refiere al transformante original y es la sola progenie del transformante que incluye un ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere al progenie producida por un

2/5  
29

cruce externo sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Aun después de retrocruzamientos repetidos a un padre recurrente el ADN insertado y el ADN de flaqueo proveniente del padre transformado esta presente en la progenie del cruce en el mismo sitio cromosomal. Normalmente, la transformación de tejido de planta produce múltiples eventos, cada uno de los cuales representa la inserción de una construcción de ADN en un sitio diferente en el genoma de una célula de planta. Con base en la expresión del transgen u otras características deseables, se selecciona un evento particular. Así, "evento MIR604", "MIR604" o "evento MIR604" como si estuviese aquí, significan que el transformante MIR604 original y/o la progenie del transformante MIR604.

[0032] "Casete de expresión" como se utiliza aquí significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótido particular en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor operablemente ligado a la secuencia de nucleótido de interés que esta operablemente a las señales de de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótido. El casete de expresión también puede comprender secuencias no necesariamente en expresión directa de una secuencia de nucleótido de interés pero que están presentes debido a los sitios de restricción convenientes para la remoción del casete de un vector de expresión. El cassette de expresión que

comprende la secuencia de nucleótido de interés puede ser quimérico, significando que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que sea de ocurrencia natural pero que haya sido obtenido de una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir en la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no ocurre naturalmente en la célula huésped y debe haber sido introducida en la célula huésped o en un ancestro de la célula huésped por un proceso de transformación conocido en la técnica. La expresión de la secuencia de nucleótido en el casete de expresión puede estar bajo el control del promotor constitutivo o de un promotor invisible que inicia la transcripción solamente cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico a un tejido particular, u órgano, o etapa de desarrollo. Un casete de expresión, o fragmento de este también se puede denominar como "secuencia insertada" o "secuencia de inserción" cuando se transforma en una planta.

[0033] UN "Gen" es una región definida que esta localizada dentro del genoma y que, además de la secuencia de ácido nucleico codificante anteriormente mencionada, comprende otra, secuencia de ácido nucleico, primariamente regulatoria,

20  
31

responsable por el control de la expresión es decir la transcripción y traducción de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias no traducidas 5' y 3' y las secuencias de determinación. Además los elementos que pueden estar presentes son por ejemplo, intrones.

[0034] "Gen de interés " se refiere a cualquier gen el cual, se transfiere a una planta, le confiere a la planta una característica deseada tal como la resistencia antibiótica, resistencia a virus, resistencia a insecto, resistencia a enfermedad, o resistencia a otras plagas, tolerancia herbicida, valor nutricional in mejorado, desempeño mejorado y un proceso industrial o una capacidad productiva alterada. El "gen de interés" también puede ser aquel que se transfiere a las plantas para la producción de enzimas comercialmente valiosas o metabólicos en la planta.

[0035] "Genotipo" como se utiliza aquí es el material genético heredado de plantas de maíz padre no toda las cuales están necesariamente expresadas en las plantas de maíz descendientes. El genotipo MIR604 se refiere al material genético heterólogo transformado en el genoma de una planta así como también en el material genético que flanquea la secuencia insertada.

[0036] Una secuencia de ácido nucleico "heteróloga" es una secuencia de ácido nucleico no naturalmente asociada con una

31  
32✓

célula huésped en la cual esta se introduce, que incluye copias múltiples de ocurrencia no natural de una secuencia de ácido nucleico de ocurrencia natural.

[0037] Una secuencia de ácido nucleico "Homóloga" es una secuencia de ácido nucleico naturalmente asociada con una célula huésped en la cual esta se introduce.

[0038] "Operablemente ligada" se refiere a la asociación de una secuencia de ácido nucleico o de secuencias de ácido nucleico de un fragmento de ácido nucleico simple de tal forma que la función de uno afecta la función del otro. Por ejemplo, un promotor esta operablemente ligado con una secuencia de codificación o un ARN funcional cuando este es capaz de afectar la expresión de aquella secuencia del ARN funcional (es decir que la secuencia de codificación o el ARN funcional esta bajo control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes en la orientación con sentido o sin sentido o antisentido pueden estar operablemente ligadas a secuencias reguladoras.

[0039] "Iniciadores" como se utiliza aquí son ácidos nucleicos aislados que son templados a una hebra de ADN blanco complementaria mediante hibridización de ácido nucleico para formar un híbrido entre el iniciador y la hebra de ADN blanco, que se extiende a lo largo de la hebra de ADN blanco mediante una polimerasa tal como la ADN polimerasa.

32  
33

Los pares o grupos de iniciadores se pueden utilizar para la amplificación de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencional.

[0040] Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al cual se une una marca convencional detectable o una molécula reportero, tal como un isótopo radioactivo, ligando agente quimiluminiscente, o encima. Tal sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico blanco en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico proveniente del evento de maíz, MIR604. El ADN genómico o MIR604 puede ser desde una planta de maíz o desde una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solamente ácidos desoxiribonucleico y ribonucleico sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN blanco y que se pueden utilizar para detectar la presencia de la secuencia de ADN blanco.

[0041] Los iniciadores y las sondas son generalmente de 10 a 15 nucleótidos o mas de longitud, los iniciadores y las sondas también pueden ser de al menos 20 nucleótidos o más de longitud, o al menos de 25 o mas, o al menos 30 nucleótidos o mas de longitud. Tales iniciadores y sondas hibridizan específicamente una secuencia blanco bajo condiciones de hibridización de alta exigencia. Los iniciadores y las sondas

23  
34

de acuerdo con la presente invención pueden tener complementariedad de secuencia completa con la secuencia blanco, aunque las sondas que difieren de la secuencia blanco y que retienen la capacidad de hibridizar las secuencias blanco se pueden designar mediante métodos convencionales.

[0042] "Condiciones de exigencia" o "condiciones de hibridización exigentes" incluyen referencia a condiciones bajo las cuales la sonda se hibridizará a su secuencia blanco a un grado detectablemente mayor y a otras secuencias. Las condiciones de exigencia son dependientes de la secuencia blanco y diferirán dependiendo de la estructura del polinucleótido. Al controlar la exigencia de la hibridización y/o las condiciones de lavado, las secuencias blanco pueden ser identificadas las cuales son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de exigencia se pueden ajustar para permitir alguna falta de coincidencia en las secuencias de tal forma que grados menores de similitud son detectados (sondeo heterólogo). Secuencias mas largas se hibridizan específicamente a temperaturas mayores. Una guía extensiva de la hibridización de los ácidos nucleicos se encuentran en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part 1, Chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier: New York; and *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Ausubel et al.,

34  
35

Eds, Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1995), and also Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (5<sup>th</sup> Ed. Cols Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0043] la especificad es típicamente la función de los lavados de post hibridización, los factores críticos son la resistencia iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Generalmente la hibridización de alta exigencia y las condiciones de lavado son seleccionadas para ser de aproximadamente 5 C menos que el punto de fusión del térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una resistencia y pH iónico definido. La  $T_m$  es la temperatura (bajo resistencia y pH iónico definido) en el cual el 50% de la secuencia blanco hibridiza a una sonda perfectamente pareada. Típicamente, bajo condiciones de alta exigencia una sonda se hibridizará a su subsecuencia blanco pero no a otras secuencias.

[0044] Un ejemplo de condiciones de hibridización de alta exigencia para la hibridización de ácidos nucleicos complementarios que tienen mas de 100 residuos complementarios de un filtro en un Southern o northern blot es 50% formamida con un mg de heparina a 42 C, siendo la hibridización llevada a cabo durante la noche. Un ejemplo de unas condiciones de lavado de muy alta exigencia es 0.15M de NaCl a 72 C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado de alta exigencia es 0.2x SSC a 65 C

35  
36

durante 15 minutos (ver, Sambrook, infra, para una descripción de un amortiguador SSC).

[0045] Las condiciones de hibridización de ejemplo para la presente invención incluyen la hibridización en 7% SDS, 0.25 M de  $\text{NaPO}_4$ , pH 7.2 a 67° C durante toda la noche, seguido por lavados en 5% de SDS, 0.20 M de  $\text{NaPO}_4$  de pH 7.2 a 65° C durante 30 minutos cada lavado, y dos lavados en 1% de SDS, 0.20 M  $\text{NaPO}_4$ , pH 7.2 a 65° C durante 30 minutos cada lavado. Un lavado de exigencia medio de ejemplo para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos es 1x SSC a 45° C durante 15 minutos. Un lavado de baja exigencia de ejemplo para un dúplex de por ejemplo mas de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40° C durante 15 minutos.

[0046] Para las sondas de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos, las condiciones de alta exigencia típicamente involucran concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1.0 M de ión Na, típicamente aproximadamente 0.01 a 1.0 M de ión N de concentración de ión Na (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30° C. Las condiciones de alta exigencia también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilantes tales como formamida. En general, una proporción de señal a ruido de 2x ( mayor) que aquella observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridización particular indica la detección de una hibridización específica. Los ácidos nucleicos que no

36  
37

se hibridizan uno al otro bajo altas condiciones de exigencia son aun sustancialmente idénticos y las proteínas que ellos codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia del ácido nucleico es creada utilizando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

[0047] Los siguientes son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridización/lavado que se pueden utilizar para hibridizar secuencias de nucleótido que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótido de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótido de referencia preferiblemente hibridiza la secuencia de nucleótido de referencia en 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.5 M de  $\text{NaPO}_4$ , 1 mM de EDTA a  $50^\circ\text{C}$  con lavado en 2x SSC, 0.1% de SDS a  $50^\circ\text{C}$  mas deseablemente en 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.5 de M  $\text{NaPO}_4$ , 1 mM de EDTA a  $50^\circ\text{C}$  con lavado en 1x SSC, 0.1% SDS a  $50^\circ\text{C}$ , mas deseablemente aun en 7% de dedocil sulfato de sodio (SDS), 0.5 M  $\text{NaPO}_4$ , 1 mM de EDTA a  $50^\circ\text{C}$  con lavado en 0.1x SSC, 0.1% SDS a  $50^\circ\text{C}$ , preferiblemente en dodecil sulfato de sodio 7% (SDS), 0.5 M de  $\text{NaPO}_4$ , 1mM de EDTA a  $50^\circ\text{C}$  con lavado en 0.1x SSC, 0.1% SDS a  $50^\circ\text{C}$ , mas preferiblemente en dedocil sulfato de sodio 7% (SDS), 0.5 M de  $\text{NaPO}_4$  1 mM de EDTA a  $50^\circ\text{C}$  con lavado en 0.1x SSC, 0.1% SDS a  $65^\circ\text{C}$ . las secuencias de la presente invención se pueden detectar utilizando todas las

37  
38

condiciones anteriores. Para los propósitos de definir la invención, se utilizan altas condiciones de exigencia.

[0048] "Transformación" es un proceso para introducir un ácido nucleico en una célula u organismo huésped. En particular, "transformación" significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

[0049] "Transformado, transgénico/recombinante" se refiere a un organismo huésped tal como una bacteria o planta en el cual la molécula de ácido nucleico heteróloga a sido introducida. La molécula de ácido nucleico puede estar establemente integrada en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico puede estar presente como una molécula extracromosómica. Tal molécula extracromosómica puede ser autoreplicante. Las células, tejidos o plantas transformadas se entiende que comprenden no solo el producto final de un proceso de transformación sino también la progenie transgénica de esta. Un huésped "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo tipo silvestre, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga. Como se utiliza aquí "transgénico" se refiere a una planta, célula de planta, a una multitud de células de planta estructuradas y no estructuradas que tienen integrado, por vía de técnicas bien conocidas de manipulación genética a una inserción de

3/6  
39

gen, una secuencia de ácido nucleico que representa un gen de interés en el genoma de la planta y típicamente en un cromosoma de un núcleo de célula, mitocondria u otros organelos que contienen los cromosomas en un locus diferente a, o en un numero de copias mayor que aquellas presentes normalmente en la plante nativa o la célula de la planta. Las plantas transgénicas resultan de la manipulación e inserción de tales secuencias de ácido nucleico, opuestas a las mutaciones de ocurrencia natural, para producir una planta de ocurrencia no natural o una planta con un genotipo de ocurrencia no natural. Las técnicas para la transformación de las plantas y las células de las plantas son bien conocidas en la técnica y pueden comprender por ejemplo la incorporación, microinyección, transformación mediada por agrobacteria, y transformación balística.

[0050] La nomenclatura para las bases de ADN y los aminoácidos como se establece en el 37 C.F.R. y 1.822 se utilizan aquí.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[0051] Esta invención se relaciona con una línea genéticamente mejorada de maíz que produce la proteína de control de insecto, Cry3A055, y la encima fosfomanosa isomerasa (PMI) que le permite a la planta utilizar la manosa como una fuente de carbón. La invención esta particularmente

39  
40

dirigida a un evento de maíz transgénico designado MIR604 que comprende un genotipo novedoso así como también a composiciones y métodos para detectar los ácidos nucleicos provenientes de este evento en una muestra biológica. la invención esta dirigida además a plantas de maíz que comprenden el genotipo MIR604, las envía transgénica proveniente de las plantas de maíz, y los métodos para producir una planta de maíz que comprenden el genotipo MIR604 mediante el cruzamiento de un endógamo de maíz que comprende el genotipo MIR604 con s mismo u otra línea de maíz. Las plantas de maíz que comprenden el genotipo MIR604 de la invención son útiles para controlar plagas de insectos coleócteros que incluyen *Diabrotica virgifera virgifera*, gusano de raíz de maíz occidental, *D. virgifera zea*, el gusano de raíz de maíz Mejicano, y *D. longicornis barberi*, el gusano de raíz de maíz del norte. Las partes de maíz que comprenden el genotipo MIR604 de la invención también son capaces de utilizar manosa como fuente de carbón

[0052] En una modalidad, la presente invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende almenos 10 o mas (por ejemplo 15, 20, 25 o 50) nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertados en el genoma de maíz del evento de maíz MIR604 y al menos 10 o mas (por ejemplo (15, 20, 25, o 50)nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de la secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de

40  
41

la planta de maíz del evento de maíz MIR604 .también están incluidas las secuencias de nucleótido que comprenden 10 o mas nucleótidos de la secuencia de inserto contigua del evento MIR604 y al nucleótido del ADN de flanqueo del evento MIR604 adyacente a la secuencia de inserto. Tales secuencias de nucleótido son diagnosticas para el evento MIR604. la amplificación del ácido nucleico del ADN del genoma del evento MIR604 produce un amplímero que comprende tales secuencias de nucleótido diagnosticas.

[0053] En otra modalidad la invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido que comprende al menos una secuencia de unión del evento MIR604 seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y complementos de esta, en donde la secuencia de unión esparce la unión entre un casete de expresión heteróloga en el genoma del maíz y el ADN del genoma de maíz que flanquea el sitio de inserción y es diagnostica para el evento.

[0054] En otra modalidad la presente invención comprende un ácido nucleico aislado que enlaza una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el evento de maíz MIR604 que comprende una secuencia desde aproximadamente 11 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y los complementos de estos.

42

[0055] En otra modalidad la invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y complementos de estos.

[0056] En una modalidad de la presente invención el amplímero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y se suministran los complementos de estos.

[0057] En otra modalidad, la presente invención comprende iniciadores de secuencia de flanqueo para detectar el evento MIR604. Tales iniciadores de secuencia de flanqueo comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1-801 de la SEQ ID NO: 3 (arbitrariamente designados aquí como la frecuencia de flanqueo 5'), o los complementos de estos. En un aspecto de la modalidad los iniciadores de la secuencia de flanqueo se seleccionan del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y complementos de estos.

42  
43

[0058] En otra modalidad la presente invención comprende iniciadores de frecuencia de flaqueo que comprenden al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 507-1570 de la SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada aquí como la secuencia de flaqueo 3'). en un aspecto de esta modalidad los iniciadores de la secuencia de flaqueo se seleccionan del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, y complementos de estos.

[0059] En aún otra modalidad la presente invención comprende un par de iniciadores de polinucleótido que comprenden un primer iniciador de polinucleótido y un segundo iniciador de polinucleótido que funcionan juntos en la presencia de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplímero diagnostico para el evento de maíz MIR604 en donde la primer secuencia del iniciador es complementaria a un genoma de planta de maíz que flanquee el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604, y la segunda secuencia del iniciador del polinucleótido es complementaria a la secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604.

[0060] En un aspecto de esta modalidad el primer iniciador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos

4/3  
44

desde la posición 1-801 de la SEQ ID NO: 3 o complementos de este. En un aspecto adicional de esta modalidad el primer iniciador de polinucleótido comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o complementos de esta. En otro aspecto de esta modalidad el primer iniciador de polinucleótido menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 507- 10570 de la SEQ ID NO: 4 o complementos de esta. En otro aspecto de esta modalidad el primer iniciador de polinucleótido comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, o complementos de estos en aun otro aspecto de esta modalidad, el segundo iniciador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, o complementos de estos. El aspecto adicional de esta modalidad el segundo iniciador de polinucleótido comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 16, a la SEQ ID NO: 38, o los complementos de estos.

[0061] En otro aspecto de esta modalidad, el primer iniciador de polinucleótido, que se establece en la SEQ ID NO: 15, y el segundo iniciador de polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 28, funciona junto en la presencia

44  
5

de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplímero diagnostico para el evento de maíz MIR604 como se describió en el ejemplo 4. en otro aspecto de esta modalidad, el primer iniciador del polinucleótido, que se establece en la SEQ ID NO: 45, y el segundo iniciador de polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 27, funciona junto en la presencia de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplímero diagnostico para el evento de maíz MIR604 como se describió en el ejemplo 4.

[0062] Por supuesto, el experto en la técnica puede obtener secuencias adicionadas en la secuencia de genoma que flanquea cualquier extremo de las secuencias de ADN heterólogas insertadas para uso como una secuencia iniciadora que se puede utilizar cada par de iniciador para amplificar las secuencias que son diagnosticas para el evento MIR604. para los propósitos de esta descripción la frase "adicionada en la secuencia de genoma que flanquea cualquier extremo de la secuencia de ADN heteróloga insertada" se refiere específicamente a un movimiento secuencial de los extremos de las secuencias de ADN heterológicas insertadas, los puntos en los cuales las secuencias de ADN insertadas son adyacentes a la secuencia de ADN genómico nativo, y por fuera del ADN geonómico del cromosoma particular en el cual la secuencias de ADN heteróloga fueron insertadas. Preferiblemente, una secuencia iniciadora que corresponde o es complementaria a

48  
46

una parte de la secuencia de inserto debe iniciar la extensión transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia delante en la unión de secuencia de flanco más cercana. Consecuentemente, una secuencia iniciadora que corresponde a/o es complementaria a una parte de la secuencia de flanco del genoma debe iniciar la extensión transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia la unión de secuencia mas cercana. Una secuencia iniciadora puede ser complementaria a, una secuencia de ADN heterólogo insertada en los cromosomas de la planta o una secuencia de flanco genómico. Un experto en la técnica reconocería fácilmente el beneficio de si la secuencia iniciadora necesitaría ser, o necesitaría ser complementaria a, la secuencia establecida dentro de la secuencia de ADN heteróloga insertada o como se establece en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 dependiendo de la naturaleza del producto deseado a ser obtenido a través del uso del anidado conjunto de iniciadores destinados para uso en amplificar una secuencia de flanco particular que contiene la unión ante la secuencia de ADN genómico y la secuencia de ADN heterólogo insertado.

[0063] En otra modalidad, la presente invención comprende un método para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica en donde el método comprende (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibridiza bajo altas condiciones de

46  
47

exigencia con el ADN genómico desde el evento de maíz MIR604 y no se hibridiza bajo altas condiciones de exigencia con el ADN de una planta de maíz de control, (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridización de alta exigencia; y (c) detectar la hibridización de la sonda al ADN. En un aspecto de esta modalidad el amplímero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y complementos de esta.

[0064] En otra modalidad, la presente invención comprende de un método para detectar la presencia de un ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica. En donde el método comprende (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibridiza bajo condiciones de alta exigencia con el ADN genómico del evento de maíz MIR604 y no se hibridiza bajo condiciones de alta exigencia con el ADN de una planta de maíz de control, (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridización de alta exigencia; (c) detectar la hibridización de la sonda al ADN. La detección puede ser por medio de cualquiera de los medios bien conocidos en la técnica que influyen pero no están limitados a fluorescente, Quimioiluminisente, radiológico, inmunológico, u otro. El caso en el cual la hibridización esta destinada a ser utilizada como medios para la amplificación de una secuencia particular para producir un amplímero que es diagnóstico para el evento de maíz MIR604,

47  
48

la producción y detección por cualquiera de los medios bien conocidos en la técnica del amplímero pretende ser indicativa de la hibridización pretendida a la secuencia blanco donde una sonda o iniciador se utiliza o la secuencia donde dos o mas sondas o iniciadores son utilizados. El termino "muestra biológica" está destinado a comprender una muestra que contiene o se sospecha que contiene un ácido nucleico que comprende de entre 5 a 10 nucleótidos laterales al punto en el cual uno de los dos extremos terminales de la secuencia de ADN heterólogo insertada contacta la secuencia de ADN geonómico dentro del cromosoma en el cual la secuencia de ADN heterólogo se inserto, aquí también conocido como las secuencias de unión. Además, las secuencias de unión comprenden tampoco como dos nucleótido, aquellos que son el primer nucleótido dentro del ADN geonómico del flaqueo adyacente y covalente mente ligado al primer nucleótido dentro de la secuencia de ADN heterólogo insertado.

[0065] En alguna otra modalidad como la presente invención comprende un Kit para detectar la presencia de los ácidos nucleicos MIR604 en una muestra biológica, en donde el kit comprende al menos una molécula de ácido nucleico de suficiente longitud de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y la SEQ ID NO: 4, que funciona como un iniciador de ADN sonda especifica para el evento MIR604, y otros

48  
49

materiales necesarios para posibilitarle al ácido nucleico la hibridización o amplificación. una variedad de método de detección se pueden utilizar que incluyen el TAIMAN (Perkin Elmer), la especificación térmica, reacciones de cadena de ligasa hibridización southern, métodos ELISA, y métodos de detección colorimétricos y fluorescentes. En particular la presente invención suministra kits para detectar la presencia de la secuencia blanco, es decir, al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la secuencia, es decir, una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la planta de maíz en el MIR604, en una muestra que contiene ácido nucleico genómico proveniente del MIR604. El kit esta comprendido de al menos un polinucleótido capas de unirse al sitio blanco o sustancialmente adyacente al sitio blanco y al menos unos medios para detectar la unión del polinucleótido al sitio blanco. Los medios para detectar pueden ser fluorescentes, quimioiluminicentes, colorimétricos, o isotópicos y se pueden acoplar al menos con métodos inmunológicos para detectar la unión. También se prevé un kit que pueda detectar la presencia del sitio blanco en una muestra, es decir al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la planta de maíz en el MIR604, tomando ventaja de dos o mas secuencias de polinucleótido las cuales juntas son capaces de unirse a la secuencia de nucleótido adyacente o dentro de aproximadamente 100 pares bases o dentro de aproximadamente 200 pares bases, o dentro de aproximadamente 500 pares bases o dentro de

41  
59

aproximadamente 1000 pares bases de la secuencia blanco y la cual se puede extender hacia cada una de las otras para formar un amplímero que contiene al menos un sitio blanco.

[0066] En otra modalidad, la presente invención comprende un método para detectar la proteína del evento MIR604 en una muestra biológica, el método comprende (a) extraer proteína de una muestra del tejido del evento de maíz MIR604; (b) ensayar la proteína extraída utilizando un método inmunológico que comprende un anticuerpo específico para el insecticida o una proteína marcadora seleccionable producida por el evento MIR604; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo al insecticida o a la proteína marcadora seleccionable.

[0067] Otra modalidad de la presente invención comprende una planta de maíz, o partes de ésta, que comprenden el genotipo del evento transgénico MIR604, en donde el genotipo comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o complementos de ésta. En un aspecto de esta modalidad, la planta de maíz es de las líneas de maíz endogamas CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316,

50  
51

BCTT609, AF031, H8431, 894, BUTT201, R327H, 2004BT, y 2070BT.

Un experto en la técnica reconocerá sin embargo, que el genotipo MIR604 se puede introducir en cualquier variedad de planta que pueda ser endógama con el maíz, incluyendo especies de maíz silvestre, y así las líneas endógamas preferidas de esta modalidad no pretenden ser limitantes.

[0068] En otra modalidad, la presente invención comprende una planta de maíz que comprende al menos una primera y una segunda secuencia de ADN junta para formar una secuencia de nucleótido contiguo, en donde la primer secuencia de ADN está dentro de la secuencia de unión y comprende al menos aproximadamente 11 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste de los nucleótidos 792-811 de la SEQ ID NO: 3; los nucleótidos 497-516 de la SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; y complementos de estos, en donde la segunda secuencia de ADN esta dentro de la secuencia de ADN de insecto heteróloga seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 y complementos de ésta, y en donde la primera y segunda secuencia de ADN son útiles como iniciadores o sondas de nucleótido para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico del evento de maíz MIR 604 en una muestra biológica. En un aspecto de esta modalidad, los iniciadores de nucleótido son utilizados en un método de amplificación de ADN para amplificar la secuencia de ADN blanco desde el ADN molde extraído de la planta de

B1  
52

maíz y la planta de maíz es identificable desde otras plantas de maíz por medio de la producción de un amplímero que se corresponde a la secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

[0069] Las plantas de maíz de la invención pueden ser adicionalmente caracterizadas en que digerir el ADN geonómico de la planta con la endonucleasa de restricción KpnI da como resultado una banda de hibridización simple cry3A055 que utiliza una sonda específica cry3A055 bajo de exigencia altas. Se ejemplifica aquí una sonda cry3A055 que comprende una secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 56 o la SEQ ID NO: 59.

[0070] Las plantas de maíz de la invención pueden ser adicionalmente caracterizadas en que digerir el ADN genómico de la planta con las endonucleasas de restricción KpnI da como resultado una banda de hibridización de pmi simple que utiliza una sonda específica pmi bajo altas condiciones de exigencia. Se ejemplifica aquí una sonda pmi que comprende una secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 62.

[0071] En una modalidad, la presente invención suministra una planta de maíz, donde el genotipo MIR604 confiere a la planta de maíz resistencia a insectos a la capacidad de utilizar manosa. En un aspecto de esta modalidad, el genotipo que confiere resistencia a insectos a las plantas de maíz

52  
53

comprende un gen *cry3A055*. En otro aspecto de esta modalidad, el genotipo que le confiere a la planta de maíz la capacidad de utilizar manosa comprende el gen *pmi*.

[0072] En una modalidad, la presente invención suministra una muestra biológica derivada de una planta de maíz con evento MIR604, tejido, o semilla, donde la muestra comprende una secuencia de nucleótido que es o es complementaria a la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 y donde la secuencia es detectable en la muestra que utiliza un método de amplificación de ácido nucleico o una método de hibridización de ácido nucleico. En un aspecto de esta modalidad, la muestra se selecciona de harina de maíz, melaza de maíz, almidón de maíz, y cereales elaborados en todo o en parte para contener productos de maíz.

[0073] En otra modalidad, la presente invención suministra un extracto derivado de una planta de maíz con evento MIR604, tejido, o semilla que comprende una secuencia de nucleótido que es o es complementaria a una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. En un aspecto de esta modalidad, la secuencia detectada en el extracto que utiliza un método de amplificación de ácido nucleico o un método de hibridización de ácido nucleico. En otro aspecto de esta modalidad, la muestra se selecciona de harina de maíz, melaza de maíz,

53  
54

aceite de maíz, harina de maíz, y cereales elaborados en todo o en todo o en parte para contener productos de maíz.

[0074 En aun otra modalidad, la presente invención suministra un método para producir una planta de maíz resistente a al menos a infestación de gusano de raíz de maíz que comprende (a) cruzar sexualmente una primer planta de maíz padre con una segunda planta de maíz padre, en donde dicha primera y segunda planta de maíz padre comprenden un ADN de evento de maíz MIR604, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de progenie de primera generación; (b) seleccionar una planta de progenie de primera generación que es resistente a al menos una infestación de gusano de raíz de maíz (c) autopolinizar la planta de progenie de primera generación, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de progenie de segunda generación; y (d) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación que es al menos resistente a infestación de gusano de raíz de maíz donde las plantas de progenie de segunda generación comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO:2.

[0075] En otra modalidad, la presente invención suministra un método para producir semillas de maíz híbrido que comprende: (a) plantar semillas en una primera línea endógama que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia e nucleótidos seleccionada del grupo que consiste

54  
55

de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4, y semillas de una segunda línea endógama que tiene un diferente genotipo; (b) cultivar plantas de maíz resultantes de dicha plantación hasta tiempo de florecimiento; (c) emasculas dichas flores de plantas de una de las líneas endógamas de maíz; (d) cruzar sexualmente las dos diferentes líneas endógamas una con la otra; y (e) cosechar la semilla híbrida producida de esta manera. En un aspecto de esta invención, la primera línea de maíz endógama suministra los padres hembra. En otro aspecto de esta modalidad, la primera línea de maíz endógama suministra los padres macho. La presente invención también comprende una semilla híbrida producida mediante el método de la modalidad y plantas híbridas crecidas de la semilla.

[0076] Un experto en la técnica reconocerá que el genotipo transgénico de la presente invención se puede introducir al cultivar en otras líneas de maíz que comprenden diferentes genotipos transgénicos. Por ejemplo, un endógamo de maíz que comprende el genotipo transgénico de la presente invención se puede cruzar con un endógamo de maíz que comprende el genotipo transgénico del evento Bt11 resistente al lepidóptero, el cual es conocido en la técnica, produciendo así semilla de maíz que comprende tanto el genotipo transgénico de la invención como el genotipo transgénico Bt11. Los ejemplos de otros ejemplos transgénicos que se pueden cruzar con un endógamo de la presente invención

55  
56

incluyen, los eventos tolerantes al glifosato Ga21 y NK603, el evento MON 802 tolerante a glifosato/resistente a insecto lepidóptero, el evento resistente al lepidóptero DBT418, el evento resistente al lepidóptero DAS-06275-8, el evento de macho estéril MS3, el evento tolerante a fosfinotricina B16, el evento resistente a insecto lepidóptero MON80100, los eventos tolerantes a fosfinotricina T14 y T25, el evento resistente a insecto lepidóptero 176, y el evento resistente al coleóptero MON863, todos los cuales son conocidos en la técnica. Se reconocerá adicionalmente que cualquier combinación se puede hacer con el genotipo transgénico de la invención y así estos ejemplos no deben ser vistos como limitantes.

[0077] Un experto en la técnica también reconocerá que la semilla de maíz transgénico que comprende el genotipo transgénico de la presente invención se puede tratar con varios químicos para tratamiento de semilla, que incluyen insecticidas, para aumentar o sinergizar la actividad insecticida de la proteína Cry3A055. Por ejemplo, la semilla de maíz transgénica de la presente invención se puede tratar con el insecticida comercial Cruiser®. Tal combinación se puede utilizar para incrementar el espectro en actividad y para incrementar la eficacia de la proteína y químico expresado.

B6  
57

### Cultivo

[0078] El genotipo transgénico de la presente invención se puede introducir en cualquier endógamo o híbrido de maíz que utiliza técnicas de cultivos reconocidas en el arte. La meta del cultivo de planta es combinar en una variedad simple o híbrida varios rasgos deseables. Para los cultivos de campo, estos rasgos pueden incluir resistencia a insectos o enfermedades, tolerancia a herbicidas, tolerancia a calor y sequía, reducción del tiempo de madurez del cultivo, mayor rendimiento y mayor calidad agronómica. Con la cosecha mecánica de muchos cultivos, la uniformidad de las características de las plantas, tales como la germinación y el establecimiento de un rodal, la velocidad de crecimiento, la madurez, y la altura de la planta y oído, es importante.

[0079] Los cultivos de campo son cosechados a través de técnicas que toman ventaja de los métodos de polinización de las plantas. Una planta es auto-polinizante si el polen proveniente de una flor es transferido a la misma o a otra flor de la misma planta. Una planta es de polinización cruzada si el polen viene de una flor de una planta diferente.

[0080] Las plantas que han sido auto-polinizadas y seleccionadas por tipo por muchas generaciones se vuelven homocigotos a casi todo locus de gen y producen una población

57  
58

uniforme de progenie de cultivo verdadera. Un cruce entre dos líneas homocigotos diferentes produce una población uniforme de plantas híbridas que puede ser heterocigoto para muchos locus gen. Un cruce de dos plantas cada una heterocigoto a un numero de locus de gen producirá una población de plantas híbridas que difieren genéticamente y no serán uniformes.

[0081] El maíz puede ser cultivado bien sea mediante técnicas de autopolinización o de polinización cruzada. El maíz tiene flores macho y hembras separadas en la misma planta, localizadas en la espinilla y la oreja, respectivamente. La polinización natural ocurre en el maíz cuando el viento hace volar el polen desde las espinillas a las sedas que sobresalen de las partes superiores de las orejas.

[0082] Un método confiable para controlar la fertilidad masculina en plantas ofrece la oportunidad para mejorar el cultivo de plantas. Esto es especialmente cierto para el desarrollo de híbridos de maíz, que se basa en alguna clase de sistema de esterilidad masculina. Existen varias opciones para controlar la fertilidad masculina disponible para los cultivadores, tales como: emasculación manual o mecánica, (o descope de maíz), esterilidad masculina citoplásmica. Esterilidad masculina genética, gamitocidas y similares.

[0083] La semilla de maíz híbrido típicamente se produce por un sistema de esterilidad masculino que incorpora descope del maíz mecánico o manual. Bandas alterna de dos maíces con sanguíneos se plantan en un campo y se remueven las espiguillas que llevan polen de una de los endógamos (hembra). Dado que existe suficiente aislamiento de las fuentes de polen de maíz externo, las espigas de maíz endógamo descopado se fertilizaran solo a partir de otro endógamo (macho), y la semilla resultante es por lo tanto híbrida y formara planta híbridas.

[0084] El laborioso, y ocasionalmente no confiable, proceso de descope de maíz se puede evitar al utilizar uno de muchos métodos de conferir esterilidad masculina genética en la técnica, cada uno con sus propios beneficios y desventajas. Estos métodos utilizan una variedad de aproximaciones tales como suministrar en la planta un gen que codifica una sustancia citotóxica asociada con el promotor específico de tejido masculino o un sistema anti sentido en el que un gen crítico para la fertilidad se identifica y un anti sentido para ese gen se inserta en la planta (ver: Fabinjanski, et al. EPO 89/3010153.8 publicación no. 329,308 y solicitud PCT/CA90/00037 publicada como WO 90/08828).

#### **Desarrollo de Líneas Endógamas de Maíz**

59  
60

[0085] El uso de endógamos estériles masculinos es solamente un factor en la producción de híbridos de maíz. Las técnicas de cultivo de plantas conocidas en el arte y utilizadas en el programa de cultivo de planta de maíz incluyen, pero no están limitadas a, selección recurrente, cruce en retroceso, cultivo por genealogía, selección mejorada de polimorfismo con restricción de longitud, selección mejorada de marcador genético y transformación. El desarrollo de híbridos de maíz en programas de cultivo de plantas de maíz requiere, en general, el desarrollo de líneas endógamas homocigotas, el cruce de estas líneas, y la evaluación de los cruces. El cultivo por genealogía y los métodos de cultivo de selección recurrente se utilizan para desarrollar líneas endógamas de poblaciones de cultivo. Los programas de cultivo de plantas de maíz combinan los fondos genéticos de dos o más líneas endógamos o varias otras fuentes de germoplasma dentro de los grupos de cultivo de los cuales las nuevas líneas endógamas se desarrollan por auto polinización y selección de fenotipos deseados. Los nuevos endógamos se cruzan con otras líneas endógamas y los híbridos de estos cruces se evalúan para determinar cual de aquellos tienen potencial comercial. El cultivo de plantas y el desarrollo de híbridos, como se practica en un programa de cultivo de planta de maíz, es costoso y es un proceso que consume tiempo.

60  
61

[0086] El cultivo genealogía comienza con el cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener uno o mas características deseables que les falta en el otro o que complementa al otro. Si los dos parientes originales no suministran todas las características deseadas, se pueden incluir otras fuentes en la población de cultivo. En el método por genealogía, las plantas superiores se auto polinizan y seleccionan en generaciones sucesivas. En generaciones sucesivas las condiciones heterocigotas dan vía a las líneas homogéneas como un resultado de la auto polinización y selección. Típicamente en el método de genealogía de cultivos de cinco o más generaciones de auto polinización y selección se práctica:  $F_1 \rightarrow F_2$ ;  $F_2 \rightarrow F_3$ ;  $F_3 \rightarrow F_4$ ;  $F_4 \rightarrow F_5$ ; etc.

[0087] El cultivo de selección recurrente, la cruza en retroceso por ejemplo, se puede utilizar para mejorar una línea endógama y un híbrido que se hace utilizando aquellos endógamos. La cruza por retroceso se puede utilizar para transferir un rasgo deseable específico de un endógamo o fuente para un endógamo que le falta ese rasgo. Este se puede acompañar, por ejemplo, al cruzar primero un endógamo superior (pariente recurrente) a un endógamo donante (pariente no recurrente), que lleva los genes apropiados para el rasgo en cuestión. La progenie de este cruce de acopla luego atrás al pariente recurrente superior seguido por la selección en la progenie resultante para que se transfiera el

b1  
b2

rasgo deseado desde el pariente no recurrente. Después de cinco o más retro cruces con selección para el rasgo deseado, la progenie será homocigota para los lugares que controlan las características que se transfieren, pero serán como el pariente superior para esencialmente todos los otros genes. La última generación de retro cruces se auto poliniza luego para dar una progenie de cultivo pura para los genes que se transfiere. Un híbrido desarrollado de endógamos que contienen los genes transferidos es esencialmente el mismo como el híbrido desarrollado de los mismos endógamos sin los genes transferidos.

[0088] Las líneas de endógamos elite, que son, cultivos puros, líneas endógamas homocigotas, también se pueden utilizar como materiales de partida para cultivo de poblaciones fuente de las cuales se desarrollan otras líneas endógamas. Estas líneas endógamas derivadas de las líneas endógamas elite se pueden desarrollar utilizando el cultivo por genealogía y los métodos de cultivo de selección recurrentes descritos anteriormente. Como un ejemplo, cuando se utiliza el cultivo por retro cruce para crear estas líneas derivadas en un programa de cultivo de plantas de maíz, se pueden utilizar endógamos elite como una línea parental o material de partida o población fuente y pueden servir como donantes o parientes recurrentes.

**Desarrollo de Híbridos de Maíz.**

62  
63

[0089] Un cruce sencillo de híbridos de maíz resulta del cruce de dos líneas endógamas, cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo del otro. La progenie híbrida de la primera generación se designa  $F_1$ . En el desarrollo de híbridos comerciales en un programa de cultivo de plantas de maíz, solo las plantas híbridas  $F_1$  se buscan. Híbridos  $F_1$  preferidos son más vigorosos que sus parientes endógamos. Este vigor híbrido, o heterosis, se pueden manifestar en muchos rasgos poligénicos, que incluyen crecimiento vegetativo aumentado y rendimiento aumentado.

[0090] El desarrollo de un híbrido de maíz en un programa de cultivo de plantas de maíz involucra tres etapas: (1) la selección de plantas de varios grupos de germoplasmas para cruces de cultivos iniciales; (2) la autopolinización de las plantas seleccionadas de los cruces de cultivos de varias generaciones para producir una serie de líneas endógamas, que, aunque diferentes unas de las otras, es un cultivo auténtico y altamente uniforme; y (3) cruzar las líneas endógamas seleccionadas con diferentes líneas endógamas para producir la progenie híbrida ( $F_1$ ). Durante el proceso de consanguinidad en el maíz, el vigor de las líneas se reduce. El vigor se restaura cuando dos líneas endógamas diferentes se cruzan para producir la progenie híbrida ( $F_1$ ). Una consecuencia importante de la homocigocidad y homogeneidad de las líneas endógamas es que el híbrido entre un par definido

de endógamos siempre será el mismo. Una vez los híbridos que tienen un híbrido superior se han identificado, la semilla híbrido se puede reproducir indefinidamente tanto tiempo como la homogeneidad de los parientes endógamos se mantengan. Mucho del vigor del híbrido exhibido por los híbridos  $F_1$  se pierde en la siguiente generación ( $F_2$ ). Por consiguiente, las semillas de híbridos no se utilizan para almacenamiento de plantas.

[0091] La producción de semillas híbridas requiere la eliminación o inactivación de polen producido por el pariente femenino. La remoción o inactivación incompleta del polen suministra el potencial para la auto polinización. Esta semilla auto polinizada advertidamente se puede cosechar intencionalmente y empacar con semillas híbridas.

[0092] Una vez se planta la semilla, es posible identificar y seleccionar estas plantas auto polinizadas. Estas plantas auto polinizadas serán genéticamente equivalentes a la línea endógama femenina utilizada para producir el híbrido.

[0093] Como es fácilmente evidente para un experto en la técnica, lo anterior solo es alguna de las varias formas de las cuales los endógamos de la presente invención se pueden obtener por aquellos que buscan introducir el genotipo transgénico de la invención dentro de otras líneas. Otros

6f  
69

medios están disponibles, y los ejemplos anteriores solo son ilustrativos.

#### **EJEMPLOS**

[0094] La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos solo se suministran para propósitos de ilustración, y no se pretende que limiten a menos de que se especifique otra cosa. El ADN recombinante estándar y la técnica de clonación molecular aquí son bien conocidas en la técnica y se describen por Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, hie. (1994); J. Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); y por TJ. Silhavy, M.L. Berman, y L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

#### **Ejemplo 1. Transformación y selección del evento MIR604**

[0095] El evento MIR604 se produce por transformación mediada por *Agrobacterium* de la línea de maíz endógama (*Zea mays*)A188. el cayo embriogénico tipo I se transforma esencialmente como se describe en Negrotto et al. (*Plant Cell Reports* 19: 798-803, 2000), incorporado aquí como referencia, utilizando un fragmento de ADN del plásmido pZM26 (Figura 1).

68  
66

El pZM26 contiene una secuencia de nucleótido que comprende casetes de expresión en tandem. El primer casete de expresión esta comprendido de una secuencia de promotor MTL (patente US 6,018,099) ligada operablemente a una secuencia que codifica cry3A055 adicionalmente ligada a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción 3' cintaza nopalina. El segundo casete de expresión esta comprendido de un promotor de ubiquitina de maíz (ZmUbiInt) (Christensen et al. 1992 PMB 18: 675) ligada operablemente a una secuencia que codifica *pmi* adicionalmente ligada en forma operable a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción des extremo 3' cintaza nopalina.

[0096] Se cortan embriones inmaduros de espigas de 8-12 días de edad y se enjuaga con medio fresco en preparación para transformación. Los embriones se mezclan con la suspensión de células *Agrobacterium* cosechadas para el vector de transformación pZM26, centrifugadas durante 30 segundos, y se les permite incubar durante cinco minutos adicionales. El exceso de solución *Agrobacterium* se aspira y los embriones se mueven luego a placas que contienen un médium de cultivo no selectivo. Los embriones se cocultivan con el *Agrobacterium* restante a 22°C durante 2-3 días en la oscuridad. Los embriones se transfectan a medio de cultivo complementado con tricarcilin (100 mg/ml) y nitrato de plata (1.6 mg/l) y se incuban en la oscuridad durante 10 días. Los embriones que

6/6  
67

producen callo embriogénico se transfieren a medio de cultivo celular que contiene mannososa.

[0097] Plántulas regeneradas se ensayan mediante análisis PCR TAQMAN® (ver ejemplo 2) para la presencia de los genes *pmi* y *cry3A055* así como también para la ausencia de el gen de estractomicina de resistencia antibiótica (*spec*). Las plantas positivas para ambos transgenes, y negativas para el gen *spec*, se transfiere al invernadero para propagación adicional. Se identifican eventos positivos y se seleccionan utilizando bioensayos de insectos contra gusano de la raíz del maíz. Los eventos insecticidas se caracterizaron por número de copia mediante análisis TAQMAN. El MIR604 se escpje para análisis adicional basado en que tiene una copia sencilla de los transgenes, buena expresión de proteína como se identifica por ELISA, y buena actividad insecticida contra gusano de la raíz del maíz.

[0098] El T<sub>0</sub> MIR604 se retro cruza con la línea de maíz endógama CG00526, creando la población T<sub>1</sub>. las plantas T<sub>1</sub> se auto polinizan para crear la generación T<sub>2</sub>, y este proceso se repite para crear la generación T<sub>3</sub>. El ensayo de la progenie de las plantas T<sub>3</sub> se emplea para identificar familias homocigotas (convertidas). El endógamo CG00526 MIR604 convertido se cruza con otras líneas endógamas elite para crear híbridos utilizados en estudios adicionales.

68

**Ejemplo 2. Detección MIR604 por PCR TAQMAN**

[0099] El análisis TAQMAN se lleva a cabo esencialmente como se describe en Ingham et al. (Biotechniques, 31:132-140, 2001) incorporado aquí como referencia. En resumen, el ADN geonómico se aísla de las hojas de plantas de almidón no transgénico y transgénico utilizando el kit de extracción de ADN geonómico Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN) esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que todas las etapas se conducen en placas de 96 posos de 1.2 ml. El glóbulo de ADN se resuspende en el amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA).

[00100] Las reacciones PCR TAQMAN se llevaron a cabo en placas de 96 posos. Para el control del gen de maíz endógeno, iniciadores y sondas se diseñaron específicos para el gen (*adh*) deshidrogenasa alcohol *Zea mays* (numero de acceso Genbank AF044295). Se reconocerá por el experto que otros genes de maíz se pueden utilizar como controles endógenos. Las reacciones se multiplexan para amplificar simultáneamente el *cry3A055* y *adh* o *pmi* y *adh*. Para cada muestra, se genera una mezcla maestra al combinar 20 µL de ADN geonómico extraído con 35 µL 2x TAQMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) complementado con iniciadores para una concentración final de 900 nM cada uno, explorador para una concentración final de 100 nM cada uno, y agua para un volumen final de 70 µL. Esta mezcla se distribuye en tres

A  
6A

replicas de 20 µL cada uno en placas de amplificación de 96 .  
posos y se sella con una película de sellada por calor  
ópticamente clara (Marsh Bio Products). El PCR se corre en el  
instrumento ABI Prism 7700 utilizando los siguientes  
parámetros de amplificación: 2 min a 50 °C y 10 min a 95° C,  
seguido por 35 ciclos de 15 s a 95° C y 1 min a 60 °C.

[00101] Los resultados del análisis TAQMAN demostraron que  
el evento MIR604 tiene una copia del gen *cry3A055* y una copia  
del gen *pmi*.

[00102] Ejemplos de combinaciones de secuencias de  
sondas/iniciadora adecuados que se utilizan son:

| Nombre Iniciador     | Secuencia Iniciadora                                                      | SEQ ID NO:    |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Cry3A055 delantero   | 5'-TACGAGAGCTGGGTGAACTTCA-3'                                              | SEQ ID NO: 47 |
| Cry3A055 reverso     | 5'-CGATCAGGTCCAGCACGG-3'                                                  | SEQ ID NO: 48 |
| Cry3A055 sonda       | 5'-CCGCTACCGCCGCGAGATGA-3'<br>(5' etiqueta= TET, 3' etiqueta = TAMRA)     | SEQ ID NO: 49 |
| PMI delantero        | 5'-CCGGGTGAATCAGCGTTT-3'                                                  | SEQ ID NO: 50 |
| PMI reverso          | 5'-GCCGTGGCCTTTGACAGT-3'                                                  | SEQ ID NO: 51 |
| PMI sonda            | 5'-TGCCGCCAACGAATCACCGG-3'<br>(5' etiqueta= TET, 3' etiqueta = TAMRA)     | SEQ ID NO: 52 |
| ZmADH-267. delantero | 5'-GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT-3'                                               | SEQ ID NO: 53 |
| ZmADH-337 reverso    | 5'-TCCAGCAATCCTTGACACCTT-3'                                               | SEQ ID NO: 54 |
| ZmADH-316 sonda      | 5'-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-3'<br>(5' etiqueta= TET, 3' etiqueta = TAMRA) | SEQ ID NO: 55 |

68  
70**Ejemplo 3. Detección de MIR604 mediante Southern Blot**

[00103] El ADN geonómico para el análisis Southern se aísla de tejido de hojas agrupado de diez plantas que representan la generación (BC6) de seis retro cruces de MIR604 utilizando esencialmente el método de Thomas et al. (Theor. Appl. Genet. 86:173-180, 1993), incorporado aquí como referencia. Todas las plantas utilizadas para aislamiento de ADN se analizan individualmente utilizando PCR TAÍMAN (como se describe en el ejemplo 2) para confirmar la presencia de una copia sencilla del gen *cry3A055* y el gen *pmi*. Para los controles de segregación negativos, se aísla el ADN del tejido de hoja agrupado de cinco plantas que representan la generación BC4 del evento MIR604. Estas plantas de segregación negativa se analizan individualmente utilizando PCR TAQMAN y los ensayos fueron negativos para la presencia del gen *cry3A055* y el gen *pmi* pero fueron, como se esperaba, positivos para el ensayo del control interno el gen *adh* de maíz endógeno.

[00104] El análisis Southern se lleva a cabo utilizando técnicas de biología molecular convencional. El ADN geonómico (7.5 µg) se digiere con la encima de restricción *KpnI*, que tiene un sitio de reconocimiento sencillo dentro del inserto de T-ADN MIR604 del plásmido pZM26 (figura 1). Esta aproximación permite la determinación del número de copias de elementos que corresponden a las sondas específicas utilizadas para cada Southern, que se ha incorporado dentro

20  
71

del MIR604. esto resulta en una banda de hibridización por copia del elemento presente MIR604. luego de electroforesis de gel agarosa y transferencia de alcalina para una membrana Nytrans®, se llevan a cabo las hibridaciones utilizando sondas generadas PCR de longitud completa especifica del elemento. La sonda utilizada en el cry3A055 y Southern blots pmí comprende las secuencias de nucleótidos establecidas en la SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 61, respectivamente. Las sondas se etiquetan con <sup>32</sup>P vía iniciadora aleatorio utilizando el sistema Rediprime™ II (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN 1633)

[00105] Se utilizaron las siguientes condiciones de hibridación estrictas: 1-2 millones de cpm/ml se agregan al PerfectHyb (Sigma) complementado con 100 µg/ml de ADN de timo de becerro (Invitrogen) precalentado a 65° C. la prehibridización tiene lugar en la misma solución como se hizo anteriormente, a la misma temperatura durante la noche o durante al menos una hora. La hibridación se lleva a cabo 65°C durante 3 horas seguidas por lavado 2X en 2X SSC, 0.1% SDS durante 20 minutos a 65°C y 2X en 0.1X SSC, 0.1% SDS durante 20 minutos a 65°C.

[00106] Se incluyen tres muestras de control en cada Southern: (1) el ADN de un segregado (no transformado) negativo utilizado para identificar cualquier secuencia *Zea mays* endógena que pueda hibridizar con la sonda del elemento

71  
72

especifico; (2) el ADN de un segregado negativo en donde se introduce una cantidad de pZM26 digerido KpnI que es igual a un numero de copia basado en la longitud de sonda, para demostrar la sensibilidad del experimento en la deteccion de una copia de gen sencillo dentro del genoma *Zea mays*; y (3) el plásmido pZM26 KpnI digerido que es igual a un numero de copia basado en la longitud de sonda, como un control positivo para la hibridación así como también para demostrar la sensibilidad del experimento.

[00107] Los datos de hibridación suministran evidencia confirmatoria para soportar el análisis PCR TAÍMAN que el MIR604 contiene una copia sencilla de los genes *cry3A055* y *pmi*, y que el MIR604 no contiene ninguna de las secuencias de estructura de vector presentes en el pZM26. como se espera para ambas sondas *cry3A055* y *pmi*, el CPU digerido resulta en una banda de hibridación sencilla del tamaño correcto, lo que demuestra que una copia sencilla de cada gen esta presente en el evento MIR604. adicionalmente, para la falta de sonda de estructura de hibridación demuestra la ausencia de secuencias de estructura de vector pZM26 que se incorporan dentro del MIR604 durante el proceso de transformación.

#### **Ejemplo 4. Secuencias de inserto de T-ADN.**

[00108] La secuencia de nucleótido del inserto de ADN transgen completo presente en el evento MIR604 se determina

para demostrar la integridad general del inserto, contigüidad de los elementos funcionales y para detectar cualquier cambio de par de bases individual. El inserto MIR604 se amplifica por PCR a partir de ADN derivado de la generación BC5 como dos fragmentos traslapantes individuales. Cada fragmento se amplifica utilizando un homologo iniciador poli nucleótido para secuencias genómicas de planta que flanquean el inserto MIR604 y un homologo iniciador poli nucleótido para el gen *cry3A055*. Para generar el fragmento 5', un primer homologo iniciador poli nucleótido de la secuencia flanqueadora 5', 5' S1 (SEQ ID NO: 15), se combina con un segundo homologo iniciador poli nucleótido para el ADN insertado dentro del gen *cry3A055*, 5' AS1 (SEQ ID NO: 28). Para generar el fragmento 3', un primer homologo iniciador poli nucleótido para la secuencia flanqueadora 3', 9268 AS (SEQ ID NO: 45), se combina con un segundo homologo iniciador poli nucleótido para el ADN insertado dentro del gen *cry3A055*, 5161S (SEQ ID NO: 27).

[00109] La amplificación PCR se lleva a cabo utilizando el sistema PCR Expand High Fidelity (Roche, Cat. No. 1732650) y los siguientes parámetros de amplificación: 2 min a 94°C durante 1 ciclo, seguido por 10 ciclos de 15 s a 94°C, 30s a 55-65°C y 5 min a 68°C, seguido por 20 ciclos de 15s 94°C, 30s a 55-65°C, y 5 min+5s/sic de 72°C, seguido por 1 ciclo de 7 min a 72°C.

73  
74

[00110] La amplificación que resulta de la amplificación PCR utilizando SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28 comprende la secuencia de unión 5' (SEQ ID NO: 1). La amplificación que resulta de la amplificación PCR utilizando la SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 27 comprende la secuencia de unión 3' (SEQ ID NO: 2). Cada fragmento de secuencia se clona individualmente dentro del vector PCR<sup>®</sup>-XL-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K4700-20) y tres clones separados para cada fragmento se identifican y se secuencian. La secuenciación se lleva a cabo utilizando el analizador ABI3730XL utilizando ABI BigDye<sup>®</sup> 1.1 o Big Dye 3.1 dGTP (para plantillas ricas en GC) química. El análisis de la secuencia se hizo utilizando el Phred, Phrap, y el paquete Consed de la universidad de Washington y se llevo a cabo con un índice de error de menos de 1 en 10,000 bases (Ewing and Green, 1998). La secuencia consensos se determina al combinar los datos de la secuencia de seis clones individuales (tres para cada fragmento de secuencia) para generar una secuencia consensos del inserto MIR604. para validar adicionalmente cualquier discrepancia de par base individual entre el inserto MIR604 y plásmido pZM26, pequeños productos PCR (aproximadamente 300- 500 bp) específicos para cualquier región en donde se pueda ver una discrepancia de par base en la secuencia consensos inicial se amplifican utilizando la misma metodología anterior. Para todas las discrepancias de par base putativas en el inserto MIR604, la secuenciación del producto PCR directa resulta en picos claros sencillos en todos los pares base en cuestión, que

24  
75

indican que estas discrepancias están probablemente presentes en el inserto MIR604. la alineación se desarrolla utilizando el programa ClustalW con los siguientes parámetros: matriz de clasificación blosum55, penalidad por abertura de espacio 15, penalidad por extensión de espacio 6.66 (Thompson et al, 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680).

[00111] Los datos de la secuencia consensos para el inserto T-ADN MIR604 demuestra que la integridad general del inserto y la contigüidad de los elementos funcionales dentro del inserto como se pretende en el pZM26 se han mantenido. El análisis de la secuencia revela que ocurre alguna truncación en el límite derecho (RB) y (SEQ ID NO: 57) y límite izquierdo (LB) (SEQ ID NO: 62) del inserto de T-ADN durante los procesos de transformación que resultan en el evento MIR604. la porción RB del inserto T-ADN se trunca por el extremo 44bp y LB del inserto T-ADN que se trunca por 43 bp. Estas eliminaciones no tienen efectos sobre la eficacia del inserto T-ADN y su fenómeno se ha observado previamente en la transformación Agrobacterium (Tinland & Hohn, 1995. Genetic Engineering, 17: 209-229). Adicionalmente, los tres cambios de base par no se notan en el inserto T-ADN MIR604. ocurre una discrepancia dentro del promotor MTL, una región de regulación que no codifica una proteína. Las restantes dos discrepancias ocurren dentro de la secuencia de codificación *pmi* y resultan en dos cambios de aminoácidos; la valina en la posición 61 se ha sustituido por alanina (V61 A) y glutamina

25  
76

en la posición 210 se ha sustituido por histidina (Q210H). la alanina son aminoácidos alifáticos que resultan en una sustitución conservadora. El reemplazo de la glutamina con histidina resulta en la sustitución de un residuo ácido por un residuo básico.

#### **Ejemplo 5. Análisis de secuencia flanqueadora de ADN**

[00112] La secuencia de ADN del genoma del maíz flanquea el ADN heterólogo insertado en el genoma de la planta del maíz del evento MIR604 que se obtiene utilizando OmniPlex™ Technology esencialmente como se describe en Kamberov et al (Proceedings of SPIE, Tools for Molecular Analysis and High-Throughput Screening, 4626:1-12, 2002), incorporado aquí como referencia.

[00113] Las secuencias flanqueadoras 5' y 3' y las secuencias de unión se confirman utilizando procedimientos PCR estándar. Las secuencias flanqueadora y de unión 5' reconfirma utilizando un primer iniciador de poli nucleótido establecido en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 combinada con un segundo iniciador de poli nucleótido establecidos en las SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17. la secuencia flanqueadora y de unión 3' se confirma utilizando un primer iniciador de poli nucleótido establecido en la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ

76  
77

ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 combinada con un segundo iniciador de poli nucleótido establecido en la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36. se reconocerá por un experto en la técnica que otras secuencias iniciadoras se pueden utilizar para confirmar la secuencia de flaqueo y unión.

[00114] El inserto MIR604 se encuentra que se flaquea el límite derecho (secuencia flaqueadora 5') por la secuencia genómica del maíz mostrada en la SEQ ED NO: 5 y flaqueada en el límite izquierdo (secuencia flaqueadora 3') por la secuencia genómica de maíz mostrada en la SEQ ID NO: 6. la secuencia de unión 5' establecida en la SEQ ID NO: 1.6.

#### **Ejemplo 6. Detección de proteína MIR604 por vía de ELISA**

[00115] Para caracterizar el rango de expresión del Cry3A055 (el principio de insecticida activo) y las proteínas (el marcador seleccionable) (PMI) fosfomannosa isomerasa en plantas MIR604, las concentraciones de de la proteína Cry3A055 y el PMI se determinaron por ELISA en varios tejidos de plantas y plantas completas en cuatro etapas de crecimiento (verticilo, antesis, madurez de la semilla y senectud) en los híbridos (MIR604-B y MIR604-C) y un endógamo (MIR604-A). los híbridos son hemizigotos para los transgenes en el evento MIR604, mientras que el endógamo fue homocigoto para los transgenes.

77  
78

[00116] Las plantas completas y las partes individuales (excepto en polen) se reducen a un fino polvo para procesar utilizando un molino de café, mezclador, molino Grindomix™ (Brinkmann Instruments; Westbury, NY, USA), mortero con pistillo o molino, o una combinación de estos dispositivos. Todo el procesamiento se hizo en la presencia de hielo seco o nitrógeno líquido. Las muestras se mezclan bien para asegurar homogeneidad. La muestra de tejido de la planta entera, o una muestra representativa, se retiene para análisis, permitiendo suficiente tamaño de muestra para almacenamiento de muestras de tejido de plantas de reserva. El porcentaje de peso seco de cada muestra se determina y se procesan y las muestras procesadas se almacenan a ca. -80°C hasta liofilización.

[00117] El tejido fresco (excepto polen y ensilado) y las muestras de plantas completas se extraen. Para cada muestra analizada, una alícuota de 1.0 g del material fresco en polvo se pesa en un tubo de 15-mm de polipropileno, suspendido en amortiguador de extracción 3 ml [50 mM CAPS, 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól, 1 mM de fluoruro 4-(1-aminoetil) bencenosulfonil HCL, 1 mM de leuteptina, pH 10], y se extrae utilizando un homogenizador Autogizer® (Tomtek; Hamden, CT, USA). Después de centrifugación durante 15 min a 10000 x g a 4°C, se utiliza para análisis de Cry3A055 y PMI por ELISA. Después de tratamiento con yodoacetamida como se describe por Hill y Straka (1988), la proteína total en los extractos se

28  
79

cuantifica utilizando el reactivo de ensayo de proteína BCA™ (Pierce; Rockford, IL, USA).

[00118] Los extractos de polen se preparan al suspender polen 1:30 (p/v). en amortiguador de extracción después de 30 min en hielo, las suspensiones de polen se interrumpen por 3 pasajes a través de célula de presión French a ca. 15.000 psi, seguido por centrifugación a 14.000 x g durante 5 min a 4°C. se desarrollo análisis para Cry3A055 y PMI por ELISA solo supernadantes como se describe adelante. La proteína total se cuantifica como se describió anteriormente.

[00119] Se preparan extractos al suspender silado 1:25 (p/v) en 2 X de amortiguador de extracción. Después de 30 min en hielo, las suspensiones de silado se extraen utilizando un homogenizador Brinkmann Polytron® (Brinkmann; Westbury, NY, USA). Después de centrifugación de 15 min a 10.000 x g a 4°C, el supernadante se utiliza para análisis Cry3A055 y PMI por ELISA. La proteína total se cuantifica como se describió anteriormente.

#### **Cuantificación de Cry3A055**

[00120] Los extractos se preparan como se describió anteriormente en donde se analizó cuantitativamente en Cry3A055 por ELISA (Tijssen, 1985) utilizando anticuerpo proclonal anti-Cry3A055 de conejo purificado de inmuno

79  
80

afinidad y anticuerpo proclonal (nativo Cry3 A de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) anti-Btt de cabra purificado de inmuoafinidad. El límite inferior de cuantificación del ELISA doble sándwich se estima basado en la concentración mas baja de la proteína de referencia pura que descansa en una porción lineal de la curva estándar, el volumen máximo de un extracto de control que se puede analizar sin interferencia de fondo, y el peso correspondiente de la muestra que la alícuota representa.

[00121] Niveles cuantificables de proteína Cry3A055 de detectan en todos los tejidos de plantas derivados de MIR604 analizados excepto el polen. En la mayoría de los casos, los resultados se presenta como medias de las cinco muestras de tejido replicadas. Para el silado, se analiza una muestra; por lo tanto, no se puede calcular la media. Los niveles de muestra de control estuvieron por debajo del límite de cuantificación para todas las etapas y tejidos.

[00122] A través de todas las etapas de crecimiento, los niveles de Cry3A055 medios medidos en hojas, raíces y toda la planta varia de ca. 3-23 µg/g de peso fresco (4-94 µg/g de peso seco), ca. 2-14 µg/g peso fresco (7-62 µg/g peso seco), y aproximadamente 0.9-11 µg/g peso fresco. (3-28 µg/g peso seco), respectivamente. Los niveles Cry3A055 medios medidos en kernels en semilla madura y senil varían de apr ximadamente 0.6-1.4 µg/g de peso fresco (0.8-2.0 µg/g

peso seco.). los niveles Cry3A055 medios medidos en tejido de seda en antesis estuvo por debajo del límite inferior de cuantificación (LOQ),  $<0.1 \mu\text{g/g}$  peso fresco ( $<1.0 \mu\text{g/g}$  peso seco). Los niveles Cry3A055 medios medidos en tejidos de seda en semilla madura variaron de aproximadamente  $0.6\text{--}1.9 \mu\text{g/g}$  peso fresco ( $1\text{--}3 \mu\text{g/g}$  peso seco). No se detectó proteína Cry3A055 en polen de MIR604-A endógamo o híbridos MIR604-B y MIR604-C [límite de detección (LOD) =  $0.07 \mu\text{g/g}$  peso fresco,  $0.15 \mu\text{g/g}$  peso seco].

[00123] Los niveles de Cry3A055 fueron generalmente similares entre los híbridos para cada tipo de tejido en cada punto de tiempo. Para la línea endógama la expresión Cry3A055 fue generalmente mayor que en las hojas de los híbridos, raíces y todas las plantas y etapa de verticilos y antesis, y en raíces en semillas maduras. Los niveles Cry3A055 medidos en tejidos de silado tuvieron un promedio de  $2.5 \mu\text{g/g}$  peso fresco ( $7.3 \mu\text{g/g}$  peso seco) durante 15, 29 y 75 días, por comparación, el nivel de Cry3A055 medido en el material picado ensilado (Día 0 pre-silado) fue de aproximadamente  $8 \mu\text{g/g}$  de peso fresco ( $20 \mu\text{g/g}$  de peso seco).

#### **Cuantificación PMI**

[00124] Los extractos preparados como se describió anteriormente fueron analizados cuantitativamente para PMI por ELISA (Tjissen, 1985) utilizando anticuerpos específicos

de cabra policlonal purificado por inmunoafinidad y de conejo policlonal purificado por proteína A para PMI. El límite inferior de la cuantificación del ELISA de doble sándwich se estima basado en la concentración mas baja de proteína de referencia pura que descansa en la porción lineal de la curva estándar, el volumen máximo de un extracto de control que se puede analizar sin interferencia de fondo, y el peso correspondiente de la muestra que la alícuota que representa.

[00125] La proteína PMI se detecta en la mayoría de los tejidos de planta derivados de MIR604 analizados, no obstante a niveles bajos. En la mayoría de los casos, los resultados se representa como medias de las cinco muestras de tejido replicado. Para silado, se analiza un replicado; por lo tanto, no se puede calcular la media. Los niveles de muestra de control estuvieron por debajo del límite de cuantificación de todas las etapas y tejidos.

[00126] A través de todas las etapas de planta, los niveles PMI medidos en las hojas, raíces y toda la planta varían de no detectable (ND) a 0.4 µg/g de peso fresco (ND-2.1 µg/g de peso seco), por debajo de LOQ (<0.03 µg/g de peso fresco) a aproximadamente 0.2 µg/g de peso fresco (<0.1-1.0 µg/g de peso seco), y por debajo de LOQ (<0.02 µg/g de peso fresco) a aproximadamente 0.3 µg/g de peso fresco (<0.04-2 µg/g de peso seco), respectivamente. Los niveles de PMI medios medidos en Kernels en madures de semilla y senectud varían desde por

47  
83

debajo del LOQ ( $<0.06 \mu\text{g/g}$  de peso fresco) a aproximadamente  $0.4 \mu\text{g/g}$  de peso fresco ( $<0.07\text{--}0.5 \mu\text{g/g}$  de peso seco). Los niveles PMI medios medidos en tejido de seda anthesis y semillas maduras varían desde por debajo del LOQ ( $<0.1 \mu\text{g/g}$  de peso fresco) a aproximadamente  $0.8 \mu\text{g/g}$  de peso fresco ( $<0.2\text{--}6.8 \mu\text{g/g}$  de peso seco). El PMI en el polen varia de aproximadamente  $1.9\text{--}2.6 \mu\text{g/g}$  de peso fresco ( $3.9\text{--}5.2 \mu\text{g/g}$  de peso seco).

[00127] Los niveles de PMI fueron generalmente similares entre los genotipos endógamos e híbridos para cada tipo de tejido en cada punto de tiempo. El PMI no fue detectable ensilado en todos los tres tiempos de muestra (día 15, 29 y 75) mientras que los niveles medidos en el material de planta picado antes de ensilado (día 0 pre-silado) fue de aproximadamente  $0.3 \mu\text{g/g}$  de peso fresco ( $0.7 \mu\text{g/g}$  de peso seco).

**Estimado total de niveles de proteína Cry3A055 por acre y por hectárea**

[00128] Para la línea endógama (MIR604-A) y los híbridos (MIR604-B y MIR604-C), las plantas alcanzaron su biomasa mas grande en la semilla madura. Las plantas también alcanzaron sus niveles mayores medios estimados Cry3A055 sobre una base por acre (y por hectárea) en semilla madura y se estimaron para continuar aproximadamente 78, 141 y 240 g Cry3A055/acre

34

(193, 348 y 592 g/hectárea) para MIR604-A, MIR604-B y MIR604-C, respectivamente. Durante la estación de crecimiento y a través de genotipos, los estimados de Cry3A055 en plantas derivadas de MIR604 varían de niveles de media de aproximadamente 8 g de Cry3A055/acre (21 g Cry3A055/hectárea) en la etapa de senectud a aproximadamente 240 g Cry3A055/acre (592 g Cry3 A055/hectárea) en semilla madura, asumiendo una densidad de plantación de 26,500 plantas por acre (65,500 plantas/hectárea).

#### **Ejemplo 7. Eficacia de campo del MIR604**

##### **Gusano de la raíz del norte y del sur**

[00129] Se ensayan plantas MIR604 para la eficacia contra el gusano de la raíz del maíz de norte y del sur en 12 ubicaciones en los Estados Unidos. Se ensaya el MIR604 con y sin la adición del tratamiento de semilla insecticida Crusier®. Los grupos de control consistieron de semillas tratadas con dos índices diferentes de Crusier® y un control no tratado. Los tratamientos consistieron de cuatro replicaciones de dos filas de 17.5-20 pies espaciada 30" en el centro designadas en un bloque completo aleatorizado. Diez plantas por tratamiento se escogen y se evalúan aleatoriamente para eficacia utilizando una escala 0-3 en donde 0= sin daño de alimentación (la calificación mas baja que se pueda dar ); 1= un nodo (circulo de raíces), o el

47  
85

equivalente de un nodo entero, comido dentro de aproximadamente dos pulgadas del tallo (línea del suelo en el séptimo nodo); 2= dos nodos completos comidos; 3= tres o mas nodos comidos (la calificación mas alta que se pueda dar). El daño entre los nodos completos comidos se nota como el porcentaje de los nodos perdidos, es decir  $1.50 = 1 \frac{1}{2}$  nodos comidos, o  $25 = \frac{1}{4}$  de los nodos comidos.

[00130] Los resultados, mostrados en la tabla 1, demuestran que las raíces de dos líneas fraternales de MIR604, 3-11 y 3-12, sostienen significativamente menos daño de alimentación que raíces de el tratamiento Cruiser® o las raíces de control no tratadas. El MIR04-3-11 y MIR604-3-12 tienen índices de daño de raíz de 0.44 y 0.42, respectivamente, comparado con los tratamientos de 0.25 y 1.25 mgA/Seed Cruiser®, que tienen índices de daño de 1.6 y 0.9, respectivamente, i la línea de control con un índice de daño de 2.14. Hubo una tendencia hacia el índice de daño de raíz mas bajo en las plantas MIR604 cuya semilla se trato con Cruiser®, los que siguiere que el Cruiser® aumenta la proteína Cry3A055 o que hubo una posible sinergia entre el Cruiser® y el Cry3A055. estos es particularmente evidente en los tratamientos con semilla de 1.0 y 1.25 mgA/MIR604 con índices de daño de raíz de 0.33 y 0.29, respectivamente.

Tabla 1. Eficacia del MIR604 con y sin tratamiento de semilla Cruiser®

| Línea de maíz      | Tratamiento Cruiser®<br>(mgA/Seed) | Calificación de daño de<br>maíz (escala 0-3 CRW) |
|--------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|
| MIR604-3-11        | 0                                  | 0.44                                             |
| MIR604-3-12        | 0                                  | 0.42                                             |
| MIR604             | 0.25                               | 0.43                                             |
| MIR604             | 0.50                               | 0.39                                             |
| MIR604             | 1.0                                | 0.33                                             |
| MIR604             | 1.25                               | 0.29                                             |
| Híbrido de control | 0.25                               | 1.60                                             |
| Híbrido de control | 1.25                               | 0.99                                             |
| Híbrido de control | 0                                  | 2.14                                             |

[00131] La eficacia del MIR604 se compara con insecticidas granulares comerciales estándar aplicados en surcos. El diseño experimental fue como se describió anteriormente. Los resultados de la tabla 2 demuestran que la eficacia del MIR604 fue comparable con los estándares comerciales en protección de plantas contra daño por alimentación de gusano de la raíz del maíz.

Tabla 2. Comparación de la eficacia de MIR604 con insecticidas comerciales aplicados en surcos.

| Tratamiento        | Clasificación de daño de raíz (escala 0-3<br>CRW) |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| MIR604             | 0.43                                              |
| Force® 3G          | 0.44                                              |
| Aztec® 6.7G        | 0.32                                              |
| Lorsban® 15 G      | 0.75                                              |
| Control no Tratado | 2.14                                              |

86  
87

Gusano de la raíz del maíz mexicano

[00132] Se evalúan plantas MIR604 para resistencia al gusano de la raíz del maíz mexicano en dos ubicaciones en Texas. El diseño experimental fue esencialmente el mismo como se describió anteriormente.

[00133] Los resultados mostrados en la tabla 3 demuestran que los frateros de MIR604 sostuvo menos daño de alimentación que los controles no tratados. Hubo una respuesta positiva para el control del gusano de la raíz del maíz mexicano cuando se agrega Cruiser a la semilla MIR604. una respuesta de índice claro fue evidente. Los resultados mostrados en la tabla 4 demuestran que la eficacia del MIR604 fue comparable con los estándares comerciales en protección de planta contra el daño por alimentación del gusano de la raíz del maíz mexicano.

Tabla 3. Eficacia de MIR604 con y sin tratamiento de semilla Cruiser contra gusano de la raíz del maíz mexicano.

| Tratamiento | Índice Cruiser®<br>(mgA/Seed) | Clasificación de daño de<br>raíz (escala 0-3 CRW) |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|
| MIR604-3-11 | 0                             | 1.14                                              |
|             | 0.125                         | 0.19                                              |
|             | 0.25                          | 0.18                                              |
|             | 0.50                          | 0.09                                              |

43  
89

|                    |       |      |
|--------------------|-------|------|
|                    | 1.25  | 0.02 |
| MIR604-3-12        | 0     | 0.68 |
|                    | 0.125 | 0.46 |
|                    | 0.25  | 0.18 |
|                    | 0.50  | 0.21 |
|                    | 1.25  | 0.04 |
| Híbrido de control | 0.125 | 1.59 |
|                    | 1.25  | 0.71 |
|                    | 0     | 2.76 |

Tabla 4. Eficacia de MIR604 comparada con insecticidas comerciales aplicada en cuatro surcos contra gusano de la raíz del maíz mexicano.

| Tratamiento        | Clasificación de daño de raíz (escala 0-3<br>CRW) |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| MIR604             | 0.68                                              |
| Force® 3G          | 0.66                                              |
| Aztec® 6.7G        | 0.88                                              |
| Lorsban® 15 G      | 0.81                                              |
| Control no Tratado | 2.76                                              |

[00134] Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en esta descripción son indicadoras del nivel de experticio en la técnica en la que esta invención pertenece. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorpora aquí como referencia para el mismo alcance como si cada solicitud individual o solicitud de patente fuera específica o individualmente indicada para ser incorporada como referencia.

28  
89

[00135] Aunque la anterior invención se ha descrito en más detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósito de claridad de entendimiento, será obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de la presente invención.

49  
90**REIVINDICACIONES**

Lo que se reivindica es:

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una secuencia de nucleótido de unión del MIR604 de evento de maíz seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1 la SEC ID NO: 2, y complementos de estos.
2. La molécula de ácido nucleico aislado que comprende al meneos 10 nucleótidos contiguos de secuencia de ADN de inserto heterólogo del MIR604 de evento de maíz y al menos 10 nucleótidos contiguos del flaqueo de ADN de genoma de planta de maíz dicha secuencia de ADN de inserto del MIR604 de evento de maíz.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2 que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de secuencia de ADN de inserto heterólogo del MIR604 de evento de maíz y al menos 20 nucleótidos contiguos del flaqueo de ADN de genoma de planta de maíz dicha secuencia de ADN de inserto del MIR604 de evento de maíz.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2 que comprende al menos 50

20  
21

nucleótidos contiguos de secuencia de ADN de inserto heterólogo de MIR604 de evento de maíz y al menos 50 nucleótidos contiguos de ADN de genoma de planta de maíz que flanquea dicha secuencia de ADN de inserto MIR604 de evento de maíz.

5. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3 SEC ID NO: 4 y complementos de estos.
6. Un ácido nucleico aislado que enlaza una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el MIR604 de evento de maíz que comprende una secuencia de aproximadamente 11 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1 SEC ID NO: y complementos de estos.
7. Un amplímero que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una secuencia de iniciador de polinucleótido para detectar ADN de MIR604 de evento de maíz en una muestra que comprende al menos 10 nucleótidos

97  
92

contiguos de la posición 1-801 como se establece en la SEC ID NO: 3, o los complementos de esta.

9. El iniciador de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 7 a la SEC ID NO: 15 y complementos de estos.

10. Un iniciador de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 507-1570 como se establece en la SEC ID NO: 4, o los complementos de estos.

11. El iniciador de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 39 a la SEC ID NO: 46, y complementos de estos.

12. Un par de iniciadores de polinucleótido que comprenden un primer iniciador de polinucleótido y un segundo iniciador de polinucleótido que funcionan juntos en la presencia de una plantilla de ADN MIR604 de evento de maíz en una muestra para producir un diagnóstico de amplímero para el MIR604 de evento de maíz, en donde la primer secuencia iniciadora es o se complementa con un genoma de planta de maíz que

flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del MIR604 de evento de maíz, y la segunda secuencia de iniciador de polinucleótido es o se complementa con la secuencia de ADN heteróloga honestada en el genoma de planta de maíz en el MIR604 de evento de maíz.

13. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el primer iniciador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 1-801 como se establece en la SEC ID NO: 3, o complementos de estos.

14. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el primer iniciador de polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 7 a SEC ID NO: y complementos de estos.

15. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el primer iniciador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 507-1570 como se

93  
94

establece en la SEC ID NO: 4, o los complementos de estos.

16. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el primer iniciador de polinucleótido comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 39 a SEC ID NO: 46 y complementos de estos.

17. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el segundo iniciador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de las SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, o SEC ID NO: 63, o complementos de estos.

18. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el segundo iniciador de polinucleótido comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 16 a SEC ID NO: 38, y complementos de estos.

19. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el primer iniciador de polinucleótidos se establece en la SEC

24  
25.

ID NO: 15 y el segundo iniciador de polinucleótido se establece en la SEC ID NO: 28.

20. El par de iniciadores de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el primer iniciador de polinucleótido se establece en la SEC ID NO: 45 y el segundo iniciador de polinucleótido se establece en la SEC ID NO: 27.

21. Un método para detectar una secuencia de ADN en una muestra, comprende:

(a) poner en contacto la muestra con un par de iniciadores que, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN del MIR604 de evento de maíz, produce un amplímero que se diagnostica para el MIR604 de evento de maíz;

(b) desarrollar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo por lo tanto el amplímero; y

(c) detectar el amplímero.

22. El método de la reivindicación 21 en donde dicho amplímero comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1, ID de SEC No.: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y complementos de estos.

23. El método para detectar la presencia de un ADN que corresponde con el evento MIR604 en una muestra, el método comprende:

(a) poner en contacto la muestra con una sonda que hibridiza bajo condiciones de alta restricción con ADN genómico del MIR604 de evento de maíz y no hibridiza bajo condiciones de alta restricción con ADN de una planta de maíz de control;

(b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridización de restricciones estrictas; y

(c) detectar la hibridización de la sonda para el ADN.

24. Un kit para detectar la presencia de ácidos nucleicos en una muestra biológica, el kit comprende al menos una molécula de ADN que comprende una longitud suficiente de nucleótidos contiguos que es o se complementa con la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4 que funciona como un iniciador de ADN o sonda específica para MIR604 de evento de maíz.

25. Un método para detectar proteína de MIR604 de evento de maíz en una muestra biológica que comprende: (a)

96  
97

extraer la proteína de una muestra de tejido de MIR604 de evento de maíz (b) ensayar la proteína extraída utilizando un método inmunológico que comprende anticuerpo específico para el insecticida o la proteína marcador seleccionable producida por el evento MIR604, y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína marcadora insecticida o seleccionable.

26. Una planta de maíz que comprende una secuencia de nucleótido establecida en la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 o los complementos de esta.

27. La planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 26, en donde digerir el ADN genómico de la planta con el *KpnI* de endonucleasa de restricción resulta en el *cry3A055* sencillo que hibridiza una banda que utiliza una sonda *cry3A055* específica bajo condiciones muy estrictas.

28. La planta de maíz de de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha sonda comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEC ID NO: 56 o SEC ID NO: 59.

97  
98

29. La planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 26, en donde digerir el ADN genómico de la planta con la restricción de *KpnI* de endonucleasa resulta en un *pmi* sencillo que hibridiza la banda utilizando una sonda *pmi* específica bajo condiciones estrictas.

30. La planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la sonda comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEC ID NO: 62.

31. La planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 26 que se deriva del evento MIR604.

32. Un kit para detectar la presencia de ADN MIR604 de evento de maíz en una muestra biológica que comprende una primer molécula de sonda que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos que es o se complementa con una secuencia de nucleótido del grupo que consiste de la SEC ID NO: 3 desde aproximadamente la posición de nucleótido 792 a aproximadamente la posición de nucleótido 811 y una segunda molécula de sonda que comprende al menos aproximadamente 8 nucleótidos contiguos que es o se complementa con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 4 de aproximadamente la posición de nucleótido 497 a la posición de nucleótido 516, en donde dicha molécula hibridiza específicamente a la

98  
99

secuencia de nucleótido bajo altas condiciones de hibridización estrictas.

33. Un método para detectar la presencia de ADN MIR604 en de evento de maíz en una muestra biológica, que comprende:

- (a) poner en contacto la muestra con un primer iniciador de que, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN del MIR604 de polinucleótido y un segundo iniciador de polinucleótido que funcionan juntos en una reacción de amplificación de ácido nucleico en la presencia DE una plantilla de ADN de MIR604 de amplímero para el de evento de maíz;
- (b) desarrollar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo por lo tanto el amplímero; y
- (c) detectar el amplímero.

34. El método de la reivindicación 33 en donde el amplímero comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1, ID de SEC No.: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y los complementos de estos.

99  
100

35. El método de la reivindicación 33 en donde los amplímeros comprenden la SEC ID NO: 1, en donde la primera secuencia de iniciador de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de la SEC ID NO: 7 a SEC ID NO: 15, y complementos de estos, y en donde la segunda secuencia de iniciador de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de SEC ID NO: 16 a SEC ID NO: 38, y complementos de estos.

36. El método de la reivindicación 33 en donde el amplímero comprende la SEC ID NO: 2, en donde la primera secuencia de iniciador de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de la SEC ID NO: 39 a SEC ID NO: 46, y complementos de estos, y en donde la segunda secuencia de iniciador de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de SEC ID NO: 16 a SEC ID NO: 38, y complementos de estos.

37. Un método para detectar ADN de MIR604 de evento de maíz en una muestra biológica, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN con una sonda de polinucleótido que hibridiza bajo altas condiciones de lavado e hibridización estrictas con el ADN MIR604 y que no hibridiza bajo altas condiciones de lavado e hibridización estricta con ADN de una planta de maíz diferente a la MIR604;

100  
[01]

(b) someter la muestra y la sonda a altas condiciones de lavado e hibridización estrictas; y

(c) detectar la hibridización de la sonda para el evento de ADN MIR604.

38. Una muestra biológica derivada de una planta de maíz MIR604 de evento, tejido, o semilla o donde la muestra comprende una secuencia de nucleótido que es o se complementa con una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 1 SEC ID NO: 2 y en donde la secuencia es detectable en la muestra utilizando un método de amplificación de ácido nucleico o método de hibridización de ácido nucleico.

39. La muestra biológica de la reivindicación 38 en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste de harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales fabricados en todo o en parte que contienen subproductos de maíz.

40. Un extracto derivado de un evento de planta de maíz MIR604, tejido, o semilla que comprende la secuencia de nucleótido homóloga o complementaria a una

101  
192

secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.

41. El extracto de la reivindicación 40 en donde la secuencia es detectable en el extracto utilizando un método de amplificación de ácido nucleico o método de hibridización de ácido nucleico.

42. El extracto de la reivindicación 41 en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste de harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz y cereales fabricados en todo o en parte que contienen subproducto de maíz.

43. Un método para producir una planta de maíz resistente a al menos el gusano de la raíz del maíz que comprende:

(a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz pariente con una segunda planta de maíz pariente, en donde dicha primera y segunda planta de maíz parientes comprenden ADN MIR604 de evento de maíz, produciendo por lo tanto una pluralidad de primera generación de plantas progenie;

102  
193

(b) seleccionar una primera generación de plantas progenie que es resistente a al menos la infestación por gusano de la raíz del maíz;

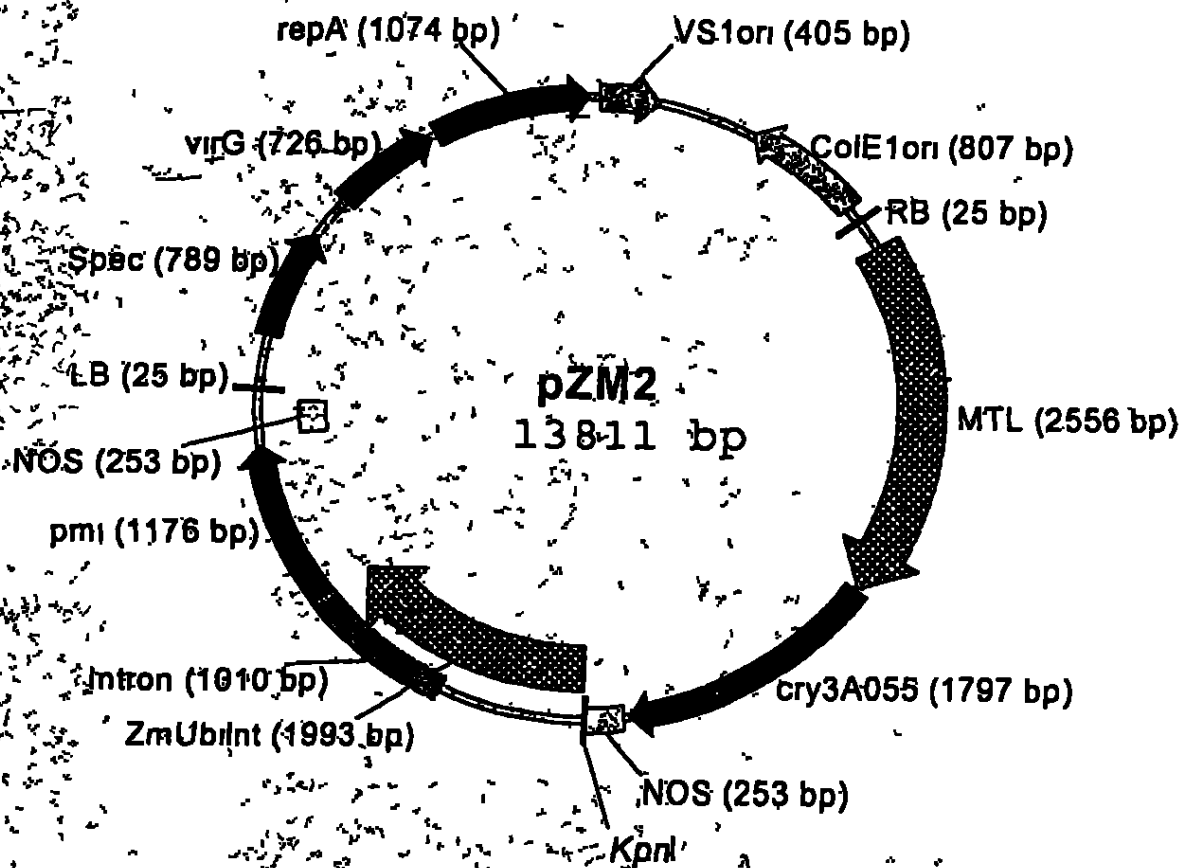
(c) autopolinizar la primer generación de planta progenie, produciendo por lo tanto una pluralidad de segunda generación de plantas progenie;

(d) seleccionar de la segunda generación de plantas progenie, una planta que es al menos resistente a la infestación por gusano de la raíz del maíz:

en donde la segunda generación de plantas progenie comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 1, y SEC ID NO: 2.

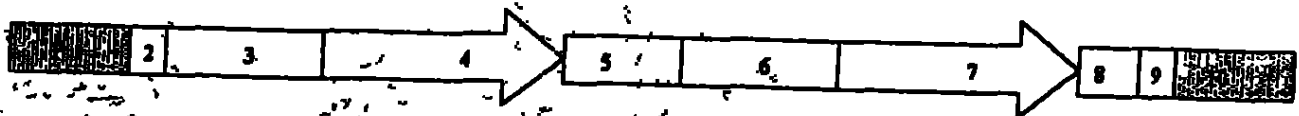
103  
104

1/2



104  
105

2/2



195  
106

## Lista de secuencias

<110> Syngenta Participations AG  
STEINER, Henry-York  
CHEN, Eric  
MEGHJI, Moez

<120> Corn Event MIR604

<130> 70227PCT

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Unión inserto-genoma 5'

<400> 1  
aattcaacag aaggcgggaa 20

<210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Unión genoma-inserto 3'

<400> 2  
tgttattaag agttggtggt 20

<210> 3  
<211> 1312  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1310)  
<223> Unión inserto-genoma 5'

<400> 3  
ccccgctgtt cgttgccctt ggccggtacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60  
ggccggccgc tgcctgcct ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120

106  
197

caccaccac cegtctttgc ccaaagcgac cgggcacagg ccgcgccggc ttcactaacc 180  
 actagcgctt gtactaataa aatggtttct agcgtttggt gctctccttt ttcttttttc 240  
 gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgcca gtccagcagg catagggtgg 300  
 tctcggcggc ggtcgtccga cgacgatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360  
 ggaaagctgg gccctttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccac 420  
 tcatttcgac gcgccctttc ttccgccacce ctctgtggccg tgtttcgcgg ccggccctta 480  
 tctctttccc gtgacgcgtt cttttgtagc ttagcgggccg gcacgttgct aaccaggcta 540  
 gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600  
 ggctctcttct gcaggcattt ggcattgtgaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagaaggacg 660  
 gatgctgctc agatacgag tcaaacctgc cggcgaaatt acggggggag ctggctggct 720  
 ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780  
 ctctgcgcac gcaattcaac agaaggcggg aaacgacaat ctgatcatga gcggagaatt 840  
 aaggagagtc cgttatgacc cccgccgatg acgcgggaca agccgtttta cgtttggaac 900  
 tgacagaacc gcaacgctgc aggaattggc cgcagcggcc atttaaatca attgggcgcg 960  
 ccgaattcga gctcgggtaca agcttgacac tgacaacaat tgtaagagga tggagaccac 1020  
 aacgatccaa caatacttct gcgacgggct gtgaagtata gagaagttaa acgcccacaa 1080  
 gccattgtgt ttggaatttt tagttattct atttttcatg atgtatcttc ctctaacatg 1140  
 ccttaatttg caaatttggg ataactactg attgaaaata tatgtatgta aaaaaatact 1200  
 aagcatattt ttgaagctaa acatgatgtt atttaagaaa atatgttggt aacagaataa 1260  
 attaatatc gaaatggaaa catctgtaaa ttagaatcat cttacaagct aa 1312

<210> 4  
 <211> 1570  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) (1570)  
 <223> Unión 3' genoma-inserto

<400> 4  
 ttgtggaaag gttctcagca gttacagctt aaaccgggtg aatcagcggt tattgccgcc 60  
 aacgaatcac cgggtgactgt caaaggccac ggccgttttag cgcgtgttta caacaagctg 120  
 taagagctta ctgaaaaaat taacatctct tgctaagctg ggagctcgat ccgtcgacct 180

197  
108

gcagatcggtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccgggtctt 240  
 gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa 300  
 tgcattgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcatt atacatttaa 360  
 tacgcgatag aaaacaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcgggtgtca 420  
 tctatgttac tagatctgct agccctgcag gaaatttacc ggtgcccggg cggccagcat 480  
 ggccgatatcc gcaatgtgtt attaagagtt ggtggtacgg gtactttaac taacgagggtg 540  
 tgtcgcgcag cgctcctgca cggatgtagc ttggattgc tggataatgt ctgcgcgaag 600  
 cgtcgtatctt atttatttat ttattacage ctccaccgcc gtgcgtgctc cgtttcggat 660  
 tataataaaa ctaattattaa ataaaaaatt cggattaaag gatgtttccg aaataaagat 720  
 ctccaccaca ggagcgaaag aaaaaaaaaag agaaacgggc tatggagaaa tgggtgttgcg 780  
 agtatacggc ggctccgtcg tcgtcggatc gacatgtaca aagtaggtgc acaaaaggca 840  
 aagcaaaatc acctcatcaa agaccaaaag cggagcaaag aatcgatact aaatccacat 900  
 ttttttttg ttctgtcta ctacgtgctg tgctgtgcg tgaagcacga ttagtacgtg 960  
 tactcactct tgtcatatc tttttagtgt cttgtcacta gtcacatgga gtagcaacca 1020  
 tggttgccga taccgcgat aaataaaaaa aagagagagg gagtaataa ttagatactc 1080  
 acccattata aatcataaaa tatttttagag ttggaatagg tagttcttgt atatttattt 1140  
 atagaccttc aagtttgtcc gcctctcgag agccgaactt tgttgcccat gcttccccgg 1200  
 ctcagggtcat gccacctcct tcaccaaggg cacacggaag atctgggtgaa gcttgtcatc 1260  
 accccgcgcc cttaaacat gtgaggatgc gtcgtcgtg gcactagtag cactcattgt 1320  
 aggcactact ttgacagttt cctccaaata tgtagttagg aaacacttga acaacacgtt 1380  
 cggattact tatgatgtt ggtnngtcca tcaatgataa ttcttcttc ttgcttaatg 1440  
 attggctcta gaaccgatac ttggcacatt tcatcaggaa gggcgcatgc acnaatttaa 1500  
 cctgttatcg atgttccggt tcttaagttg aagaaaacaa tggctaacaa ttagcccatg 1560  
 gcataac 1570

<210> 5  
 <211> 801  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(801)  
 <223> Secuencia flanqueadora 5'

108  
109

&lt;400&gt; 5

```

ccccgcgttt cgttgccctt ggccggtacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60
ggccggccgc tcgctcgctt ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120
caccaccac cgtcttttgc ccaaagcgac ccggcacagg ccgcgccggc ttcactaac 180
actagcgctt gtactaataa aatgggttct agcgtttgtt gctctctttt ttctttttt 240
gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgtcca gtccagcagg cataggggtg 300
tctcggcggc ggtcgtccga cgacgatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360
ggaaagctgg gcccttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac gcgccttttc ttgccaccc ctcgtggcgg tgtttcgcgg ccggccctta 480
tctcttccc gtgacgcgtt cttttgtagc ttagcggcgg gcacgttgct aaccaggcta 540
gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggctcttct gcaggcattt ggcatgtgaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagatggacg 660
gatgctgctc agatacgcg tcaaacctgc cggcgaaatt acggggggag ctggctggct 720
ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780
ctctgcgcac gcaattcaac a 801

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1064

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(1064)

&lt;223&gt; Secuencia flanqueadora 3'

&lt;400&gt; 6

```

agttgggtgtt acgggtactt taactaacga ggtgtgtcgc gcagcgctcc tgcacggatg 60
tagctttgga ttgctggata atgtctcgcg caagcgctcgt atttatttat ttatttatta 120
cagcctccac cgcctgtcgt gtcctgttcc ggattataat aaaactaata ttaataaaa 180
aaatcggatt aaaggatggt tccgaataa agatctccac cacaggagcg aaagaaaaaa 240
aaagagaaac gggctatgga gaaatggtgt tgcgagtata cggcggctcc gtcgtcgtcg 300
gatcgacatg tacaaagtag gtgcacaaaa ggcaaagcaa aatcacctca tcaaagacca 360
aaagcggagc aaagaatcga tactaaatcc acatgttttt tttgttctg tctactacgt 420
gctgtgcctg tgcgtgaagc acgattagta cgtgtactca ctcttgcct attcttttta 480
gtgtcttgtc actagtcaca tggagtagca accatggctg gcgatacccg cgataaataa 540

```

109  
110

```

aaaaaagaga gagggagtaa tatattagat actcaccat tataaattat aaatatttt 600
agagtttgaa taggtagttc ttgtatattt atttatagac cttcaagttt gtcgcctct 660
cgagagccga actttgttgc ccatgcttcc cgggtcagg tcatgccacc tcttcacca 720
agggcacacg gaagatctgg tgaagcttgt catcaccccg cgcccttcaa acatgtgagg 780
atgcgtcgtc gctggcacta gtagcactca ttgtaggcac tactttgaca gtttctcca 840
aatatgtagt gaggaacac ttgaacaaca cgtttgggat tacttatgat gtttggttng 900
tccatcaatg ataattcctt cttcttgett aatgattggc tctagaaccg atacttggca 960
catttcatca ggaagggcgc atgcacnaat ttaacctggt atcgatgttc cggttcctaa 1020
gttgaagaaa acaatggcta acaattagcc catgtgagca taac 1064

```

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Iniciador MIR604 (59)

<400> 7  
 cgctcgctt tggattcttc 20

<210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Iniciador MIR604 (60)

<400> 8  
 agccgctga tgggatggt 19

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Iniciador MIR604 (54)

<400> 9  
 cgttcgtttt taatctgcct atcg 24

<210> 10  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

110  
111

<220>  
<223> Iniciador MIR604(55)

<400> 10  
aggcatttgg catgtgaagg aa

22

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604(38)

<400> 11  
atgtgaagga acccgaacca g

21

<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604(39)

<400> 12  
gtgaatggag atggacggat g

21

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604(51)

<400> 13  
agatcacac atggatgacg c

21

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

<220>  
<223> Iniciador SEN 604

<400> 14  
gtgacgcgtt cttttgtagc

20

<210> 15  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

111  
112

WO 2005/103301

PCT/US2005/004790

<220>  
<223> Iniciador 5'S1

<400> 15  
tgaatggaga tggacggatg ctg

23

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

<220>  
<223> Iniciador MTL (11)

<400> 16  
-- attagaatca tcttacaagc taa

23

<210> 17  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MTL (10)

<400> 17  
ctaagagatg ttcacgcttt gag

23

<210> 18  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MTL AS

<400> 18  
ctcaacga aggctgctgc

20

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

<220>  
<223> Iniciador WRSEN-1

<400> 19  
gcatgtctct gtgtectctg

20

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

113

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS-1

&lt;400&gt; 20

aggcacgcta tcggaggta

20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WR-1

&lt;400&gt; 21

ggacatcgcc gagttctaca

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WR-2

&lt;400&gt; 22

gatgtgcttc ctgatgcagg

20

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRSEN-2

&lt;400&gt; 23

agcaata agacgacttg

20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS-2

&lt;400&gt; 24

agcaccacca aggacgtgat

20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

1/3  
1.14

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRSEN-3

&lt;400&gt; 25

tacaacagct tcaacctggc

20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS-3

&lt;400&gt; 26

ccgtgaacta gatctgagct

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador 5161S

&lt;400&gt; 27

tcaaccaata ctacttcgac aa

22

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador 5'AS1

&lt;400&gt; 28

aagaccat caacaagggc gac

23

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRSEN-4

&lt;400&gt; 29

atcggcgttc cggtcctatgg tt

22

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

144  
115  
/

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS-4

&lt;400&gt; 30

ggaatcctgg gatggctcta

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PMI-1

&lt;400&gt; 31

gatgtgcttc ctgatgcagg

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PMI-2

&lt;400&gt; 32

ctggaagtga tggcaaac

18

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PMI(6)

&lt;400&gt; 33

gctgcatga ccttagtgat a

21

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PMI(7)

&lt;400&gt; 34

cgggtgaatc agcgtttatt g

21

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

148  
116

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PMI(5)

&lt;400&gt; 35

ttgccgcraa cgaatcac

18

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PMI(16)

&lt;400&gt; 36

agtccgcraa ttatacattt aat

23

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRSEN-5

&lt;400&gt; 37

gaaaatgccg caggtatccc

20

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS 5

&lt;400&gt; 38

aggtgcaca tccggcgatt

20

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador MIR604 (20)

&lt;400&gt; 39

gctcctgcac ggatgtagct

20

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

118  
117

<220>  
<223> Iniciador MIR604 (21)

<400> 40  
gctttggatt gctggataat gtc

23

<210> 41  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> MIR604 (31)

<400> 41  
ccaccacagg agcgaaagaa aaa

23

<210> 42  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604 (30)

<400> 42  
gggctatgga gaaatggtgt tg

22

<210> 43  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604 (40)

<400> 43  
ttcaccaag ggcacacgg

19

<210> 44  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Iniciador MIR604 (41)

<400> 44  
atgtgaggat gctgctcg

19

<210> 45  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

119

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador 9268AS

&lt;400&gt; 45

cacggatgta gctttggatt

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador WRAS-6

&lt;400&gt; 46

tccaccacag gagcgaaaga

20

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan cry3A055-forward

&lt;400&gt; 47

atcgagagct gggatgaactt ca

22

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan cry3A055-reverse

&lt;400&gt; 48

gatcaggtc cagcacgg

18

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan cr3A055-probe

&lt;400&gt; 49

ccgctaccgc cgcgagatga

20

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

119

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan pmi-forward

&lt;400&gt; 50

ccgggtgaat cagcggtt

18

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan pmi-reverse

&lt;400&gt; 51

gccgtggcct ttgacagt

18

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TaqMan pmi-probe

&lt;400&gt; 52

tgccgccaac gaatcaccgg

20

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador ZmADH-267

&lt;400&gt; 53

aacgtgtgt tgggtttgca t

21

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador ZmADH-337

&lt;400&gt; 54

tccagcaatc cttgcacctt

20

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

49  
120

<220>

<223> ZmADH-316 probe

<400> 55

tgcagcctaa ccatgcgcag ggta

24

<210> 56

<211> 779

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MIR604 probe

<400> 56

ggacatcgcc gagttctaäa agcgccagct gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg 60

cgtgaagtgg tacaacgtgg gtctagacaa gctccgoggc agcagctacg agagctgggt 120

gaacttcaac cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgccctgtt 180

ccccctgtac gacgtgcgcc tgtaccccaa ggaggtgaag accgagctga cccgcgacgt 240

gctgaccgac cccatcgtgg gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa 300

catcgagaac tacatccgca agccccacct gttegactac ctgcaccgca tccagttcca 360

cacgcgtttc cagccccggt actacggcaa tgacagcttc aactactgga gcggcaacta 420

cgtgagcacc cgccccagca tcggcagcaa cgacatcatc accagccccct tctacggcaa 480

caagagcagc gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaagggtgt accgcgcctg 540

ggctaacacc aacctggccg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaagggtgga 600

gttcagccag tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg 660

caacgtgggc gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga 720

cccctggag aagggctaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcagg 779

<210> 57

<211> 183

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumifaciens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(183)

<223> Right border region

<400> 57

gaaggcggga aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgaccc 60

ccgccgatga cgcgggacaa gccgttttac gtttggaact gacagaaccg caacgctgca 120

ggaattggcc gcagcggcca tttaaataaa ttgggcgcgc cgaattcgag ctccgtacaa 180

120  
121

gct

183

<210> 58  
 <211> 2556  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2556)  
 <223> MTL promoter

<400> 58  
 tgcacatgac aacaattgta agaggatgga gaccacaacg atccaacaat acttctgcga 60  
 cgggctgtga agtatagaga agttaaacgc ccaaaagcca ttgtgtttgg aatttttagt 120  
 tattctatctt ttcatgatgt atcttctctt aacatgcctt aatttgcaaa ttgtgtataa 180  
 ctactgattg aaatatatg tatgtaaaaa aatactaagc atatttttga agctaaacat 240  
 gatgttatctt aagaaaatat gttgttaaca gaataagatt aatatcgaaa tggaaacatc 300  
 tgtaaattag aatcatctta caagctaaga gatgttcacg ctttgagaaa cttcttcaga 360  
 tcatgaccgt agaagtagct ctccaagact caacgaaggc tgctgcaatt ccacaatgc 420  
 atgacatgca tccttgtaac cgtcgtcgcc gctataaaca cggataactc aattccctgc 480  
 tccatcaatt tagaaatgag caagcaagca cccgacgct caccatcat gcaccaatct 540  
 gactcccaag ctctgtttcg cattagtacc gccagcactc cacctatagc taccaattga 600  
 gacctttcca gcctaagcag atcgattgat cgtagagtc aaagagttgg tggtaacggg 660  
 actttaacta ccatggaatg atggggcgtg atgtagagcg gaaagcgct ccctacgcgg 720  
 acaacaccc tcgcatgcc gctcgactac agcctcctc tcgtcgccgc cacaacgagg 780  
 gagcccggtg tcgcagccac cgaccagcat gtctctgtgt cctcgtccga cctcgacatg 840  
 tcatggcaaa cagtcggacg ccagcaccag actgacgaca tgagtctctg aagagcccg 900  
 cacctagaaa gatccgagcc ctgctgctgg tagtggtaac cattttcgtc gcgctgacgc 960  
 ggagagcgag aggccagaaa tttatagcga ctgacgctgt ggcaggcacg ctatcggagg 1020  
 ttacgacgtg gcgggtcact cgacgcggag ttacaggtc ctatccttgc atcgctcggc 1080  
 gcggagttaa cggggactta tccttacgac gtgctctaag gttgcgataa cgggcggagg 1140  
 aaggcgtgtg gcgtgcggag acggtttata cacgtagtgt gcgggagtgt gtttcgtaga 1200  
 cgcgggaaag cagcagact tacgaaggtt agtggaggag gaggacacac taaatcagg 1260  
 acgcaagaaa ctcttctatt atagtagtag agaagagatt ataggagtgt gggttgattc 1320

121  
122

```

taaagaaat cgacgcagga caaccgtcaa aacgggtgct ttaatatagt agatatatat 1380
atatagagag agagagaaag tacaaggat gcatttgtgt ctgcatatga tcggagtatt 1440
actaacggcc gtcgtaagaa ggtccatcat gcgtggagcg agcccatttg gttggttgc 1500
aggccgcagt taaggcctcc atatatgatt gtcgtcgggc ccataacagc atctctcca 1560
ccagtttatt gtaagaataa attaagtaga gatatttgtc gtcgggcaga agaaacttgg 1620
acaagaagaa gaagcaagct aggccaattt cttgccggca agaggaagat agtggcctct 1680
agtttatata tcggcgtgat gatgatgctc ctagctagaa atgagagaag aaaaacggac 1740
gcgtgttttg tgtgtgtcaa tggcgtccat cctcccatca gatcagaacy atgaaaaagt 1800
caagcacggc atgcatagta tatgtatagc ttgttttagt gtggctttgc tgggacgaat 1860
gaaagcaacg gcgggcatat ttttcagtgg ctgtagcttt caggctgaaa gagacgtggc 1920
atgcaataat tcagggaatt cgtcagccaa ttgaggtagc tagtcaactt gtacattggg 1980
gcgagcaatt ttccgcactc agggaggcta gtttgagagt ccaaaaacta taggagatta 2040
aagaggctaa aatcctctcc ttatttaatt ttaataagt agtgtatttg tattttaact 2100
cctccaaccc ttccgatttt atggctctca aactagcatt cagtctaag catgcatgct 2160
tggctagagg tcgtatgggg ttgttaatag catagctagc tacaagttaa ccgggtcttt 2220
tatatttaat aaggacaggc aaagtattac ttacaataa agaataaagc taggacgaac 2280
tgctggatta ttactaaac gaaatggacg taatattcca ggcaagaata attgttcgat 2340
caggagacaa gtggggcatt ggaccggtc ttgcaagcaa gagcctatgg cgtggtgaca 2400
cggcgcgctg ccatacatc atgcctccat cgatgatcca tctcacttg ctataaaaag 2460
aggtgtccat ggtgctcaag ttcagccaag caataagac gacttgcttc attgattctt 2520
aagagatcg agcttctttt gcaccacaag gtcgag 2556

```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 1797

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cry3A055 gene

&lt;400&gt; 59

```

atgacggccg acaacaacac cgaggccctg gacagcagca ccaccaagga cgtgatccag 60
aagggcatca gcgtggtggg cgacctgctg ggcgtggtgg gcttccccctt cggcggcgcc 120
ctggtgagct tctacaccaa cttcctgaac accatctggc ccagcgagga cccctggaag 180
gccttcatgg agcaggtgga ggcctgatg gaccagaaga tcgccgacta cgccaagaac 240

```

132  
123

aaggcactgg ccgagctaca gggcctccag aacaacgtgg aggactatgt gagcgccctg 300  
 agcagctggc agaagaaccc cgctgcaccg ttccgcaacc cccacagcca gggccgcatc 360  
 cgcgagctgt tcagccaggc cgagagccac ttccgcaaca gcatgccag cttcgccatc 420  
 agcggctacg aggtgctgtt cctgaccacc tacgcccagg ccgccaacac ccacctgttc 480  
 ctgctgaagg acgcccacat ctacggagag gagtggggct acgagaagga ggacatcgcc 540  
 gagtcttaca agcggcagct gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg cgtgaagtgg 600  
 tacaacgtgg gtctagacaa gctccgcggc agcagctacg agagctgggt gaacttcaac 660  
 cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgcccgtgt cccctgtac 720  
 gacgtgcgcc tgtaccccaa ggaggtgaag accgagctga cccgcgacgt gctgaccgac 780  
 cccatcgtgg gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca cttcagcaa catcgagaac 840  
 tacatccgca agccccacct gtctgactac ctgcaccgca tccagttcca cagcggtttc 900  
 cagccccggct actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta cgtgagcacc 960  
 cgccccagca tcggcagcaa cgacatcatc accagcccct tctacggcaa caagagcagc 1020  
 gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaaggtgt accgcgccgt ggctaacacc 1080  
 aacctggccg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaaggtgga gttcagccag 1140  
 tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg caacgtgggc 1200  
 gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg cccccgaga ccaccgacga gccctggag 1260  
 aagggctaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcaggg cagccgcggc 1320  
 accatccccg tgctgacctg gaccacaaag agcgtcgact tcttcaacat gatcgacagc 1380  
 aagaagatca cccagctgcc cctggtgaag gcctacaagc tccagagcgg cgccagcgtg 1440  
 tggcaggcc cccgcttcac cggcggcgac atcatccagt gcaccgagaa cggcagcgcc 1500  
 gccaccatct acgtgacccc cgacgtgagc tacagccaga agtaccgcgc ccgcatccac 1560  
 tacgccagca ccagccagat caccttcacc ctgagcctgg acggggcccc cttaaccaa 1620  
 tactacttcg acaagacct caacaagggc gacacctga cctacaacag cttaaacctg 1680  
 gccagcttca gcaccccttt cgagctgagc ggcaacaacc tccagatcgg cgtgaccggc 1740  
 ctgagcgccg gcgacaagggt gtacatcgac aagatcgagt tcatccccgt gaactag 1797

<210> 60  
 <211> 253  
 <212> ADN  
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<220>

123  
124

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(253)  
 <223> NOS terminator

<400> 60  
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60  
 atgattatca tataatttct gttgaattac gtttagcatg taataattaa catgtaatgc 120  
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180  
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240  
 atgttactag atc 253

<210> 61  
 <211> -1993  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1993)  
 <223> ZmUbInt promoter

<400> 61  
 ctgcagtga gcgtagcccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60  
 agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120  
 tctttataca tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180  
 tatcagtgtt tttagaattc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga 240  
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 300  
 ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360  
 ttttaggggt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420  
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaaat aatttagata 480  
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa 540  
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600  
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcggggcaa gcgaagcaga 660  
 cggcacggca tctctgtcgc tgctcttggg cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720  
 acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780  
 ggcaggcggc ctctctctcc tctcaccgca ccggcagcta cgggggatcc ctttcccacc 840  
 gtccttctgc ttctccttcc tcgcccgcg taataaatac acacccctc cacacccctc 900  
 tcccccaacc tcgtgttgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca 960

124  
125

```

cccgtcggca cctccgcttc aaggtaacgcc gctcgtccctc cccccccccc cctctctacc 1020
ttctctagat cggcggttccg gtccatgggt agggcccggt agttctactt ctgttcatgt 1080
ttgtgttaga tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac 1140
ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtggt ttctcttttg ggaatcctgg 1200
gatggctcta gccgttccgc agacgggacg gatttcata ttttttttgt ttcgttgcat 1260
agggttttgt ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 1320
atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctgggttg gcggtcgttc 1380
tagatcggag tagaattctg ttccaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 1440
tgtgtgtgcc atacatatcc atagttacga attgaagtgt atggatggaa atactgatct 1500
aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcac atacagagat gcttttttgt 1560
cgcttggttg tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 1620
gaactactgt tcnaactacc tgggtgattt attaatgttg gaactgtatg tgtgtgtcat 1680
acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatct gatctaggat aggtatacat 1740
gttgatgttg gttttactga tgcataata tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800
tctaaccctg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 1860
tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920
catacgttat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgttttgt 1980
gttacttctg cag 1993

```

```

<210> 62
<211> 1176
<212> ADN
<213> E.coli

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1176)
<223> pm1 gene

```

```

<400> 62
atgcaaaac tcattaactc agtgcaaaac tatgcctggg gcagcaaaac ggcgttgact 60
gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa 240
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcacca 300
aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggat cccgatggat 360

```

125  
126

```

gccgccgagc gtaactataa agatectaac cacaagccgg agctgggttt tgcgctgacg      420
cctttccctg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg      480
gtcgcagggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta      540
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg      600
attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt      660
tctgaatttt acccggaaga cagcgggtctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa      720
ttgaatccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc      780
gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa      840
tacattgata ttccggaaat gggtgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag      900
ttgttgacct agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat      960
tttgccctct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc     1020
gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtga aaggttctca gcagttacag     1080
cttaaacggg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc     1140
cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa .                               1176

```

```

<210> 63
<211> 323
<212> ADN
<213> Agrobacterium tumifaciens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(323)
<223> Left border region

```

```

<400> 63
gatcggtcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgc      60
atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc     120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac     180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct     240
atgttactag atctgctagc cctgcaggaa atttaccggg gcccgggcgg ccagcatggc     300
cgtatccgca atgtgttatt aag                                              323

```

# PCT

## REQUEST

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

For receiving Office use only

International Application No

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) 70227WOPCT

Box No. I TITLE OF INVENTION  
CORN EVENT MIR604

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Syngenta Participations AG  
Schwarzwaldallee 215  
4058 Basel/CH

Telephone No.  
41 61 3231111

Facsimile No.  
41 61 3235044

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality  
CH

State (that is, country) of residence  
CH

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

STEINER, Henry-York  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality  
US

State (that is, country) of residence  
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

WARREN, Gregory W.  
Syngenta Biotechnology, Inc.  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America

Telephone No.  
919-541-8646

Facsimile No.  
919-541-8689

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office  
48,385

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent

122  
128

129  
128

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

CHEN, Eric  
Syngenta Biotechnology, Inc.  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

TW

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MEGHJI, Moez  
Syngenta Biotechnology, Inc.  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

126  
129

**Supplemental Box** If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request

1 If, in any of the Boxes, except Boxes Nos VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information in such case, write "Continuation of Box No. " (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular

(i) if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available in such case, write "Continuation of Box No III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No III The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below:

(ii) if, in Box No II or in any of the sub-boxes of Box No III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked in such case, write "Continuation of Box No II" or "Continuation of Box No III" or "Continuation of Boxes No II and No III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

(iii) if, in Box No II or in any of the sub-boxes of Box No III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America in such case, write "Continuation of Box No II" or "Continuation of Box No III" or "Continuation of Boxes No. II and No III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

(iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No IV, there are further agents in such case, write "Continuation of Box No IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No IV.

(v) if, in Box No VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed in such case, write "Continuation of Box No VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No VI

**CONTINUATION OF BOX IV:**

YATES, Michael  
STULTS, Larry  
VRANA, Bruce  
KAKEFUDA, Mary  
LEBEL, Edouard

All of Syngenta Biotechnology, Inc.:

3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America  
Telephone Number: 919-541-8501  
Facsimile Number: 919-541-8689

2 If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(ii) and 49bis 1(a) or (b)).

3 If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application. in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis 1(d))

129  
130

Box No. V DESIGNATIONS

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

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

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

Box No. VI PRIORITY CLAIM

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

| Filing date of earlier application (day/month/year) | Number of earlier application | Where earlier application is:                 |                                       |                                            |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
|                                                     |                               | national application country or Member of WTO | regional application* regional Office | international application receiving Office |
| item (1)<br>25 March 2004                           | 60/556,260                    | US                                            |                                       |                                            |
| item (2)                                            |                               |                                               |                                       |                                            |
| item (3)                                            |                               |                                               |                                       |                                            |

- ☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box

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

- ☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

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

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

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

ISA / US

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

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

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

|                                                       |                                                                                                                                      | Number of declarations |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)             | Declaration as to the identity of the inventor                                                                                       | :                      |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii)            | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent             | :                      |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii)           | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | :                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)                               | 3                      |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v)             | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty                                                       | :                      |

180  
131

**Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP** (only for the purposes of the designation of the United States of America)  
The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214, see Notes to Boxes Nos VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No VIII (iv) If this Box is not used, this sheet should not be included in the request

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))  
for the purposes of the designation of the United States of America:**

I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application)

This declaration is directed to international application No PCT/ (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter)

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4 10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed

Prior Applications: 60/556,260 filed March 25, 2004 ..

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C F R § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application

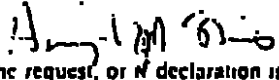
I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon

Name **STEINER, Henry-York**

Residence **Research Triangle Park, North Carolina**  
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address **3054 Cornwallis Road**  
**Research Triangle Park, North Carolina 27709**

Citizenship **United States of America**

Inventor's Signature   
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

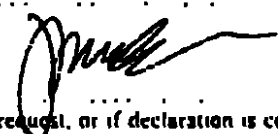
Date **Jan 16, 2005**  
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

Name **CHEN, Eric**

Residence **Research Triangle Park, North Carolina 27709**  
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address **3054 Cornwallis Road**  
**Research Triangle Park, North Carolina 27709**

Citizenship **Taiwan**

Inventor's Signature   
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Date **Jan 18, 2005**  
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

☒ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No VIII (iv)"

131  
132

## Continuation of Box No. VIII (i) to (v) DECLARATION

If the space is insufficient in any of Boxes Nos. VIII (i) to (v) to furnish all the information, including in the case where more than two inventors are to be named in Box No. VIII (iv) in such case, write "Continuation of Box No. VIII" (indicate the item number of the Box) and furnish the information in the same manner as required for the purposes of the Box in which the space was insufficient. If additional space is needed in respect of two or more declarations, a separate continuation box must be used for each such declaration. If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

MEGHJI, MOEZ  
14658 East 925 North Road  
Bloomington, IL 61704-5989  
United States of America  
Citizenship: US

Signature: J. Haughey

Date: 01/13/05

122  
133

## Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

| This international application contains                                                                                        | This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)                                                         | Number of items |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| (a) In paper form, the following number of sheets                                                                              | 1 <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet                                                                                                                                                                 | 1               |
| request (including declaration sheets) 7                                                                                       | 2 <input checked="" type="checkbox"/> original separate power of attorney                                                                                                                                                   | 1               |
| description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) 42                                                      | 3 <input type="checkbox"/> original general power of attorney                                                                                                                                                               |                 |
| claims 7                                                                                                                       | 4 <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any                                                                                                                                      |                 |
| abstract 1                                                                                                                     | 5 <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature                                                                                                                                                           |                 |
| drawings 2                                                                                                                     | 6 <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s)                                                                                                                                         |                 |
| Sub-total number of sheets 59                                                                                                  | 7 <input type="checkbox"/> translation of international application into (language)                                                                                                                                         |                 |
| sequence listing 21                                                                                                            | 8 <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material                                                                                                             |                 |
| tables related thereto                                                                                                         | 9 <input checked="" type="checkbox"/> sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)                                                                                                     |                 |
| (for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form, see (c) below) | (i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)                                                               |                 |
| Total number of sheets 80                                                                                                      | (ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter            |                 |
| (b) <input type="checkbox"/> only in computer readable form (Section 801(a)(i))                                                | (iii) <input checked="" type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column                                                      | 1               |
| (i) <input type="checkbox"/> sequence listing                                                                                  | 10 <input type="checkbox"/> tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)                                                                                             |                 |
| (ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto                                                                           | (i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)                                                    |                 |
| (c) <input type="checkbox"/> also in computer readable form (Section 801(a)(ii))                                               | (ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) |                 |
| (i) <input type="checkbox"/> sequence listing                                                                                  | (iii) <input type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column                                                                           |                 |
| (ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto                                                                           | 11 <input type="checkbox"/> other (specify) Credit card Form; Return postcard.                                                                                                                                              | 2               |
| Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the                                       |                                                                                                                                                                                                                             |                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> sequence listing: diskette                                                                 |                                                                                                                                                                                                                             |                 |
| <input type="checkbox"/> tables related thereto                                                                                |                                                                                                                                                                                                                             |                 |
| (additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)                                           |                                                                                                                                                                                                                             |                 |
| Figure of the drawings which should accompany the abstract                                                                     | Language of filing of the international application                                                                                                                                                                         | English         |

## Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request)

  
 Gregory W. Warren  
 (Reg. No. 48,385)

| For receiving Office use only                                                                                                              |                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Date of actual receipt of the purported international application.                                                                      | 2. Drawings.<br><input type="checkbox"/> received.<br><br><input type="checkbox"/> not received |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application |                                                                                                 |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)                                                              |                                                                                                 |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent) ISA /                                                                  | 6 <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid          |

| For International Bureau use only                              |
|----------------------------------------------------------------|
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau |

134 123

WO 2005/103301  
PCT/US2005/00479

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

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

To

WARREN, Gregory, W  
Syngenta Biotechnology, Inc.  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, NC 27709  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)  
03 November 2005 (03 11 2005)

Applicant's or agent's file reference  
70227WOPCT

IMPORTANT NOTICE

International application No  
PCT/US2005/004790

International filing date (day/month/year)  
16 February 2005 (16.02.2005)

Priority date (day/month/year)  
25 March 2004 (25.03.2004)

Applicant  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG et al

The International Bureau transmits herewith the following documents

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 03 November 2005 (03 11 2005) under No WO 2005/103301
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No WO  
For an explanation as to the reason for this republication of the international application reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

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

Authorized officer  
Athina Nickitas-Etienne

Facsimile No +41 22 740 14 35

Facsimile No +41 22 328 80 05

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
3 November 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2005/103301 A2

(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C12Q 1/68, A01H 1/00, C12N 15/82, A01H 5/00

(21) International Application Number: PCT/US2005/004790

(22) International Filing Date: 16 February 2005 (16 02 2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/556,260 25 March 2004 (25 03 2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH/CI], Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): STEINER, Henry-York [US/US], 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US) CHEN, Eric [-/US], Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US) MEGHLI, Moez [US/US], Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US)

(74) Agents: WARREN, Gregory, W. et al., Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US)

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

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

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

(54) Title: CORN EVENT MIR604

(57) Abstract: A novel transgenic corn event designated MIR604, is disclosed. The invention relates to DNA sequences of the recombinant constructs inserted into the corn genome and of genomic sequences flanking the insertion site that resulted in the MIR604 event. The invention further relates to assays for detecting the presence of the DNA sequences of MIR604, to corn plants and corn seeds comprising the genotype of MIR604 and to methods for producing a corn plant by crossing a corn plant comprising the MIR604 genotype with itself or another corn variety

→ G.W.

PATENT COOPERATION TREATY

136133  
WO 2005/103301  
PCT/US2005/004790

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

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

To:

RECEIVED

MAY 1 / 2006

WARREN, Gregory, W.  
Syngenta Biotechnology, Inc. SYNGENTA  
3054 Cornwallis Road PATENT & LICENSING (RTP, NC)  
Research Triangle Park, NC 27709  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)  
04 May 2006 (04.05.2006)



Applicant's or agent's file reference  
70227WOPCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.  
PCT/US2005/004790

International filing date (day/month/year)  
16 February 2005 (16.02.2005)

Priority date (day/month/year)  
25 March 2004 (25.03.2004)

Applicant

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG et al

International Bureau transmits herewith the following documents:



copy of the international application as published by the International Bureau on under  
No. WO



copy of international application as republished by the International Bureau on 04 May 2006 (04.05.2006) under  
No. WO 2005/103301

For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)  
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

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

Authorized officer

Athina Nickitas-Etienne

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 89 95



**PCT**

1997年12月15日

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

22

(N4) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GI, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declaration under Rule 4.17:**  
— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

**Published:**  
— with international search report

**(86) Date of publication of the international search report:**  
**4 May 2006**

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

(75) **Inventors/Applicants (for US only):** STEINER, Henry-York [US/US]; 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US). CHEN, Erle [—/US], Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US). MEGHJI, Moez [US/US], Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

(74) Agents: WARREN, Gregory, W. et al.; Syngenta Biotechnology, Inc., 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

**(57) Abstract:** A novel transgenic corn event designated MIR604, is disclosed. The invention relates to DNA sequences of the recombinant constructs inserted into the corn genome and of genomic sequences flanking the insertion site that resulted in the MIR604 event. The invention further relates to assays for detecting the presence of the DNA sequences of MIR604, to corn plants and corn seeds comprising the genotype of MIR604 and to methods for producing a corn plant by crossing a corn plant comprising the MIR604 genotype with itself or another corn variety.

**WO 2005/103301 A3**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) : A01H 5/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; G01N 33/53

US CL : 800/320.1; 435/6, 7.1; 536/24.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 800/320.1; 435/6, 7.1; 536/24.3; 424/750

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

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

US-PGpub; JPO, EPO, Derwent; USPat, Agricola, Biosis, Caplus, CABA:

Search term. MIR604; cry3A055; phosphomannose isomerase, p2M2

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to-claim No.          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| A          | US 2003/0120054 A1 (CHEN et al) 26 June 2003 (26.06.2003) see entire document.     | 2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33, 37 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## Special categories of cited documents

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

T

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X

document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y

document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art

A

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 December 2005 (30.12.2005)

Date of mailing of the international search report

30 JAN 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Andrei K. Kupelik

Telephone No. (571) 272-0547

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1, 5-6, 8-11, 13-20, 22, 24, 26-32, 34-36 and 38-43  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The computer readable form of the sequence listing is not in the correct format; the "n"s are not defined. Thus, claims drawn to specific sequences could not be searched.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

138  
139

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US05/04790

139  
140

## BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 2-4, 7, 12, 21, 23, 33 and 37, drawn to nucleic acids comprising junction sequences of corn event MIR604; primers that are diagnostic for corn event MIR604; and a method of detecting corn event MIR604 by using the primers.

Group II, claim(s) 25, drawn to a method of detecting corn event MIR604 by using antibodies to cry3A055.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The technical feature linking the Groups is cry3A055, which is present in corn event MIR604. CHEN et al (US 2003/0120054) teaches cry3A055 (SEQ ID NO:8). Thus, the technical feature linking the groups is not special.

→ G.W.

140  
141

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED  
FEB 02 2006

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:  
GREGORY W. WARREN  
SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, INC.  
3054 CORNWALLIS ROAD  
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709

PCT

SYNGENTA

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

(PCT Rule 44.1)

|                                                     |                                                                          |                                                   |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>70227WOPCT |                                                                          | Date of mailing (day/month/year)<br>30 JAN 2006 ✓ |
| FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below     |                                                                          |                                                   |
| International application No.<br>PCT/US05/04790     | International filing date (day/month/year) 16 February 2005 (16.02.2005) |                                                   |
| Applicant<br>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG             |                                                                          |                                                   |

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

Filing of amendments and statement under Article 19:

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

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.

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

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.  
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

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

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

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 28 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

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

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

|                                                                                                                                                                                       |                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (571) 273-3201 | Authorized officer<br><i>[Signature]</i><br>Telephone No. (571) 272-0547 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                     |                                                                                          |                                                                         |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>70227WOPCT | FOR FURTHER ACTION<br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below |                                                                         |
| International application No.<br>PCT/US05/04790     | International filing date (day/month/year)<br>16 February 2005 (16.02.2005)              | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br>25 March 2004 (25.03.2004) |
| Applicant<br>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG             |                                                                                          |                                                                         |

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.



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

## 1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



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

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



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

6. With regard to the drawings,

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



as suggested by the applicant.



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



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

b. ☒

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

## a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

## b. format of material



on paper



in electronic form

## c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2 ☒

In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments: The computer readable form of the sequence listing is not in the correct format; the "n"s are not defined. Thus, claims drawn to specific sequences could not be searched.

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:  
GREGORY W. WARREN  
SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, INC.  
3054 CORNWALLIS ROAD  
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709

## PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

|                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>70227WOPCT</b>                                                                                                                                                       |                                                                                    | Date of mailing<br>(day/month/year) <b>30.04.2006</b>               |
| <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>See paragraph 2 below                                                                                                                                                               |                                                                                    |                                                                     |
| International application No.<br><b>PCT/US05/04790</b>                                                                                                                                                           | International filing date (day/month/year)<br><b>16 February 2005 (16.02.2005)</b> | Priority date (day/month/year)<br><b>25 March 2004 (25.03.2004)</b> |
| International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC<br><b>IPC(8): A01H 5/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; G01N 33/53; A01N 65/00 and US CL: 800/320.1; 435/6, 7.1; 536/24.3; 424/750</b> |                                                                                    |                                                                     |
| Applicant<br><b>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG</b>                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                     |

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

### 2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

|                                                                                                                                                                                        |                                                                           |                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (571) 273-3201 | Date of completion of this opinion<br><b>18 January 2006 (18.01.2006)</b> | Authorized officer<br><br><b>J. Kubelik</b><br>Telephone No. (571) 272-0547 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2005)

143  
144

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

144  
145

## BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 2-4, 7, 12, 21, 23, 33 and 37, drawn to nucleic acids comprising junction sequences of corn event MIR604; primers that are diagnostic for corn event MIR604; and a method of detecting corn event MIR604 by using the primers.

Group II, claim(s) 25, drawn to a method of detecting corn event MIR604 by using antibodies to cry3A055.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The technical feature linking the Groups is cry3A055, which is present in corn event MIR604. CHEN et al (US 2003/0120054) teaches cry3A055 (SEQ ID NO:8). Thus, the technical feature linking the groups is not special.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) : A01H 5/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; G01N 33/53  
US CL : 800/320.1; 435/6, 7.1; 536/24.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 800/320.1; 435/6, 7.1; 536/24.3; 424/750

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

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

US-PCpub; JPO, EPO, Derwent; USPat, Agricola, Biosis, Caplus, CABA

Search term: MIR604; cry3A055; phosphomannose isomerase, pZM2

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| A          | US 2003/0120054 A1 (CHEN et al) 26 June 2003 (26.06.2003) see entire document.     | 2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33, 37 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

### Special categories of cited documents

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

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

Date of the actual completion of the international search

30 December 2005 (30.12.2005)

Date of mailing of the international search report

30 JAN 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Anne K. Kupelick

Telephone No. (571) 272-0547

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/04790

146  
147

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1, 5-6, 8-11, 13-20, 22, 24, 26-32, 34-36 and 38-43  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The computer readable form of the sequence listing is not in the correct format; the "n"s are not defined. Thus, claims drawn to specific sequences could not be searched.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US03/04790

147  
148

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
  - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
  - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:

See the lack of unity section of the International Search Report (Form PCT/ISA/210)

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33 and 37

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US05/04790

148  
149

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☐ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
- ☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US05/04790

149  
150

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 1,5,6,8-11,13-20,22,24 and 26-43

because:

- ☐ the said international application, or the said claim Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 1,5,6,8-11,13-20,22,24,26-32,34-36 and 38-43 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

The computer readable form of the sequence listing is not in the correct format; the "n"s are not defined. Thus, claims drawn to specific sequences could not be searched.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1,5,6,8-11,13-20,22,24,26-32,34-36 and 38-43

- ☒ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☒ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

180  
151

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/US05/04790

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

|                               |                                              |     |
|-------------------------------|----------------------------------------------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims <u>2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33, 37</u> | YES |
|                               | Claims <u>NONE</u>                           | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims <u>2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33, 37</u> | YES |
|                               | Claims <u>NONE</u>                           | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims <u>2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33, 37</u> | YES |
|                               | Claims <u>NONE</u>                           | NO  |

2 Citations and explanations:

Claims 2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33 and 37 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest corn event MIR604.

Claims 2-4, 7, 12, 21, 23, 25, 33 and 37 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

151  
152

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ US

# PCT

## CHAPTER II

### DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:  
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

| For International Preliminary Examining Authority use only                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                      |                                                                                  |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--|
| Identification of IPEA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                      | Date of receipt of DEMAND                                                        |  |
| <b>Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION</b>                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                      | Applicant's or agent's file reference<br><b>70227 WOPCT</b>                      |  |
| International application No.<br><b>PCT/US05/04790</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                | International filing date (day/month/year)<br><b>16 February 2005<br/>(16.02.05)</b> | (Earliest) Priority date (day/month/year)<br><b>25 March 2004<br/>(25.03.04)</b> |  |
| Title of invention<br><b>CORN EVENT MIR604</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                      |                                                                                  |  |
| <b>Box No. II APPLICANT(S)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                      |                                                                                  |  |
| Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)<br><b>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG<br/>Schwarzwaldallee 215<br/>4058 Basel/CH</b>                                                                                       |                                                                                      | Telephone No.<br><b>41 61 3231111</b>                                            |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                      | Facsimile No.<br><b>41 61 3235044</b>                                            |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                      | Teleprinter No.                                                                  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                      | Applicant's registration No. with the Office                                     |  |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>CH</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                      | State (that is, country) of residence:<br><b>CH</b>                              |  |
| Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)<br><b>STEINER, Henry-York<br/>Syngenta Biotechnology, Inc.<br/>3054 Cornwallis Road<br/>Research Triangle Park, North Carolina 27709<br/>United States of America</b> |                                                                                      |                                                                                  |  |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>US</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                      | State (that is, country) of residence:<br><b>US</b>                              |  |
| Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)<br><b>CHEN, Eric<br/>Syngenta Biotechnology, Inc.<br/>3054 Cornwallis Road<br/>Research Triangle Park, North Carolina 27709<br/>United States of America</b>          |                                                                                      |                                                                                  |  |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>TW</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                      | State (that is, country) of residence:<br><b>US</b>                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further applicants are indicated on a continuation sheet                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                      |                                                                                  |  |

152  
153

Sheet No. . 2

International application No  
PCT/US05/04790

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation The address must include postal code and name of country)

MEGHIJI, Moez  
Syngenta Seeds, Inc.  
New Traits Development  
14658 East 925 North Road  
Bloomington, IL 61704-5989  
United States of America

State (that is, country) of nationality  
US

State (that is, country) of residence:  
US

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation The address must include postal code and name of country)

State (that is, country) of nationality.

State (that is, country) of residence.

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation The address must include postal code and name of country)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence.

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation The address must include postal code and name of country)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐

Further applicants are indicated on another continuation sheet.

153  
154

Sheet No 3

International application No  
PCT/US05/04790

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative  
and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination  
☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked  
☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address *(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation  
The address must include postal code and name of country)*  
  
WARREN, Gregory W.  
Syngenta Biotechnology, Inc.  
3054 Cornwallis Road  
Research Triangle Park, North Carolina 27709  
United States of America

Telephone No  
919-541-8646  
  
Facsimile No  
919-541-8689  
  
Teleprinter No.  
  
Agent's registration No with the Office  
48,385

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:\*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:  
☒ the international application as originally filed  
the description ☐ as originally filed  
☐ as amended under Article 34  
the claims ☐ as originally filed  
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)  
☐ as amended under Article 34  
the drawings ☐ as originally filed  
☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ Where the IPEA wishes to start the international preliminary examination at the same time as the international search in accordance with Rule 69.1(b), the applicant requests the IPEA to postpone the start of the international preliminary examination until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis 1(a)

\* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended

Language for the purposes of international preliminary examination: English .....

☒ which is the language in which the international application was filed.  
☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.  
☐ which is the language of publication of the international application.  
☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

154  
155

Sheet No 4

International application No  
PCT/US05/04790

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination

- |   |                                                                       |          |
|---|-----------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 | translation of international application                              | sheets   |
| 2 | amendments under Article 34                                           | sheets   |
| 3 | copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | sheets   |
| 4 | copy (or, where required, translation) of statement under Article 19  | sheets   |
| 5 | letter                                                                | sheets   |
| 6 | other (specify) Credit card form                                      | 1 sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only  
received not received

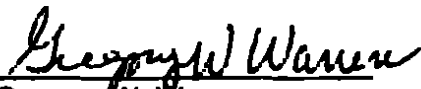
- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below

- |                                                                                        |                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet                            | 5 <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature                  |
| 2 <input type="checkbox"/> original separate power of attorney                         | 6 <input type="checkbox"/> sequence listing in electronic form                     |
| 3 <input type="checkbox"/> original general power of attorney                          | 7 <input type="checkbox"/> tables in electronic form related to a sequence listing |
| 4 <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney, reference number, if any | 8 <input type="checkbox"/> other (specify)                                         |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand)

  
Gregory W. Warren  
Registration Number 48,385

For International Preliminary Examining Authority use only

1 Date of actual receipt of DEMAND.

2 Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b)

3 ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly

4 ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5

5 ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

6 ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.

7 ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.

8 ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

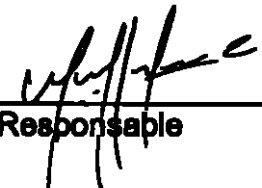
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

  
Firma Responsable

Fecha 22 de sep 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10  
Conmutador: 3 82 08 40  
Fax: 350 52 20  
E-mail: [info@slc.gov.co](mailto:info@slc.gov.co)  
[www.slc.gov.co](http://www.slc.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia

157

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
ESCOBAR URIBE JIMENA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

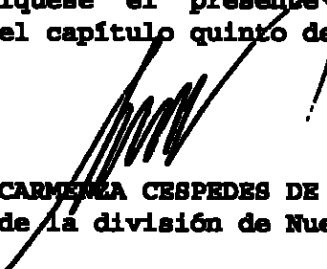
|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 6 95570           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2005/004790 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 25/10/2006        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 0014270           |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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

  
ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 11 DIC. 2006  
adpall