



No. 07-136194- -00005-0000

Fecha: 2012-09-24 16:05:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 78

As. 105.754

Señor

**DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **07.136194-** solicitud de patente de invención a favor de **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** Título **EVENTO MON89788 DE SOYA Y METODOS PARA LA DETECCION DEL MISMO**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., reasumo como apoderado de la sociedad solicitante dando respuesta al oficio número 11164 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 27 de Junio de 2012.

Con relación a las reivindicaciones, nos permitimos modificar la reivindicación 1 a las secuencias 1,2,3,4 o 9. Las nuevas secuencias 3 y 4 corresponden a regiones flanqueantes y la secuencia NO: 9 es la secuencia del inserto transgénico que encierra el ADN genómico en donde cada una de estas secuencias comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2. Estas modificaciones se encuentran debidamente sustentadas en la figura 1 de la presente solicitud. Adicionalmente, la nueva reivindicación 1 ha sido modificada para indicar una molécula de ácido nucleico en lugar de una secuencia de ácido nucleico.

Con relación a las excepciones de patentabilidad, hemos eliminado las reivindicaciones en cuestión.

No compartimos la objeción de su despacho según la cual la descripción no presenta información suficiente los productos alimenticios (...). Específicamente la descripción establece lo siguiente:

"Otro aspecto de la invención es una planta de soya, o semilla o **producto** derivado de una planta o semilla que comprende el evento MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2".

"Otro aspecto todavía de la invención es una planta de soya, o semilla, o **producto** derivado de una planta o semilla que comprende MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, en donde las moléculas de cebador de ADN SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se usan en el método de amplificación de ADN".

"Aún otro aspecto de la invención es una planta de soya, semilla, **producto**, o mercancía derivada de la planta o semilla, que comprende MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, en donde las moléculas de cebador de ADN SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 se usan en el método de amplificación de ADN. El producto o mercancía puede comprender, sin limitación, un alimento o **producto alimenticio que comprende o se deriva de uno o más de los siguientes productos de una planta de soya que comprende el evento MON89788: lecitina, ácidos grasos, glicerol, esteroles, aceite comestible, hojuelas de soya desengrasada, alimentos de soya incluyendo alimentos de soya desengrasados y tostados, leche de soya cuajada, tofu, harina de soya, concentrado de proteína de soya, proteína de soya aislada, proteína vegetal hidrolizada, proteína de soya texturizada, y fibra de proteína de soya**". (negrilla fuera de texto)

Adicionalmente las figuras 2A y 2B presentan diagramas de procesamiento de diferentes tipos de productos de soya.

En vista de lo anterior y teniendo en cuenta los conocimientos básicos de una persona versada en la materia consideramos que existe el sustento suficiente para reivindicar los productos alimenticios de la presente invención. Sin embargo, teniendo en cuenta las políticas restrictivas de su despacho las reivindicaciones de productos alimenticios han sido eliminadas.

Con relación a la definición del evento MON89788, se ha definido en términos de las secuencias SEQ ID NO: 1,2,3,4 o 9.

Solicitud divisional

Presentamos a consideración de su Despacho una solicitud divisional dirigida a las reivindicaciones 2-5, 11, 22-23.

En cuanto al equipo de detección, notamos que es importante para proteger una de las modalidades de la invención en donde dicho equipo es útil para identificar ADN del evento de soya en una muestra y donde se puede aplicar a métodos para la procreación de plantas de soya que contienen ADN. Este equipo se encuentra debidamente sustentado en la descripción como sigue:

“Los equipos de detección de ADN se pueden desarrollar usando las composiciones descritas en la presente y los métodos descritos o conocidos en la técnica de detección de ADN. Los equipos son útiles para la identificación de ADN del evento de soya en una muestra y se pueden aplicar a métodos para la procreación de plantas de soya que contienen ADN. Los equipos pueden contener cebadores o sondas de ADN que son homólogos o complementarios a SEQ ID NOs:1-4 y 9 o cebadores o sondas de ADN homólogos o complementarios a ADN contenido en los elementos genéticos transgénicos de ADN, estas secuencias de ADN se pueden usar en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN”

Consideramos que la reivindicación 14 es clara por sí misma y en vista de las enseñanzas de la descripción.

En cuanto a las reivindicaciones 11,15,18 y 19 notamos que las reivindicaciones 11 y 15 han sido eliminadas. Con relación a las reivindicaciones 18 y 19 no vemos como pueden interpretarse como resultados a alcanzar. La reivindicación 18 está dirigida a un método definido por 3 etapas claramente definidas:

- a) Poner en contacto una muestra
- b) Realizar una reacción de amplificación para producir un amplicón diagnóstico y
- c) Detectar el amplicón diagnóstico

Su despacho sugiere que se deberían indicar los cebadores a emplear y las condiciones necesarias para llevar a cabo el método de amplificación. Con relación a esta sugerencia, consideramos que sería una restricción muy excesiva definir el método por etapas específicas teniendo en cuenta el espíritu de la invención. Creemos que una persona versada en la materia está en la capacidad de utilizar el método reivindicado en vista de la totalidad de las enseñanzas de la descripción.

De la misma manera la reivindicación 19 define las siguientes etapas:

- a) Obtener una muestra de soya y
- b) Analizar la muestra para la presencia de una secuencia de ADN del evento

Consideramos que restringir la materia de esta reivindicación a condiciones específicas afectaría en gran medida el alcance de la invención. Como en el caso del método de la reivindicación 18 consideramos que el mismo es claro para una persona versada en la materia en vista de las enseñanzas de la descripción.

En cuanto a la novedad de la reivindicación 18 la damos por superada teniendo en cuenta que se ha especificado las secuencias del evento MON89788.

En cuanto al nivel inventivo de las reivindicaciones 19 y 20 notamos que ninguna de los antecedentes hacen referencia al evento reivindicado específicamente el evento que comprende el trasngen revelado en una ubicación específica del genoma ni tampoco métodos para reivindicar el mismo. Ahora bien, si bien es cierto el estado de la técnica revela métodos de detección de eventos diferentes al reivindicado pero que comprenden el inserto CP4 EPSPS, la ubicación exacta de este trasngen en el genoma de soya que resulta en el evento reivindicado solamente se describe en la presente invención por lo que una persona versada en la materia no habría podido llegar de manera evidente a la invención. Esto solamente lo vemos posible mediante un análisis en retrospectiva en donde la materia reivindicada sirve como punto de partida para seleccionar secciones particulares del estado de la técnica para llegar el ácido nucleico y al método de detección reivindicado.

Particularmente, si una persona versada en la materia utilizara el trasngen CP4 EPSPS revelado en los antecedentes para transformar plantas de soya, sería prácticamente imposible producir y seleccionar el mismo evento. Para sustentar esta afirmación, proponemos el siguiente argumento:

La planta de soya presenta un genoma haploide de un tamaño aproximado de 1,100 MB equivalente a 1,100 millones de bases. Por lo tanto, asumiendo que únicamente el 10 % de dicho genoma fuera adecuado para llevar a cabo una transformación transgénica se tendría tan solo una oportunidad de 1 en 110 millones de obtener el evento reivindicado así como el método de detección del mismo.

Como indicio adicional del nivel inventivo de la presente invención hacemos referencia a los efectos inesperados conseguidos con las plantas transgénicas modificadas con el evento reivindicado. Por ejemplo, las plantas que comprenden el evento de la invención MON89788 producen rendimientos mucho más elevados en comparación a plantas que han sido modificadas con otros eventos. Para sustentar este efecto inesperado, adjuntamos al presente memorial una declaración de uno de los inventores de la invención Nancy Taylor en donde se demuestra el salto sobre el estado de la técnica de la presente invención.

En dicha declaración, las plantas de soya que comprenden el evento reivindicado, presentaron un incremento del 7 % en comparación a las plantas de soya reveladas en D1 las cuales comprenden el evento 40-3-2 el cual comprende un trasngen resistente al glifosato en una ubicación diferente en el genoma. Estos dos eventos tanto el de la invención como el de D1 presentan antecedentes genéticos similares (A3244) y por lo tanto, el estudio adjunto representa una comparación entre líneas isogenicas muy cercanas (aproximadamente 94 %) de identidad genética en donde la principal diferencia recae en el constructo transgénico así como su ubicación en el genoma de soya.

Lo anterior permite concluir sin discusión alguna que el incremento en el rendimiento de la planta de soya con el evento reivindicado puede atribuirse precisamente al evento novedoso e inventivo de la invención pero de ninguna manera a alguna diferencia en los antecedentes genómicos de la soya.

Como sustento adicional del excelente rendimiento obtenido con las plantas de la invención, tenemos el del ejemplo 3 de la solicitud US 60/685,584 (adjunto al presente memorial) que es la solicitud prioritaria de la presente invención. En dicho ejemplo el evento 40-3-2 produjo un rendimiento de 60.7 Bu/acre mientras que el evento reivindicado produjo un rendimiento de 65.6 bu/acre lo cual demuestra un claro incremento de 8 %.

En este orden de ideas, los métodos para detectar el evento específico de la presente invención son novedosos e inventivos. Específicamente, sería prácticamente imposible diseñar cebadores o iniciadores apropiados (primers) para identificar la presencia del evento reivindicado sin tener conocimiento del sitio de inserción específico.

Contrario a lo afirmado por su despacho en el oficio técnico, el simple conocimiento de la secuencia del inserto revelado en D1 y D2 no sería suficiente para producir los cebadores o iniciadores necesarios requeridos para identificar la presencia del evento reivindicado más aun sin conocer el sitio de inserción específico.

Así, a la hora de diseñar un par de cebadores o iniciadores que sean útiles para la detección de un evento, uno de dichos iniciadores debe diseñarse para que corresponda con la secuencia genómica flanqueante del sitio de inserción. Es así como el diseño de un método diagnóstico de la presencia de un evento específico requiere de un profundo conocimiento del sitio de empalme en donde el DNA insertado se une al DNA genómico.

En este orden de ideas, el diseño de un cebador o iniciador sería imposible sin conocer el sitio en donde ocurre la inserción, o las secuencias del ADN genómico flanqueante o las secuencias del sitio de empalme.

En consecuencia, el diseño de los métodos reivindicados implica actividad inventiva mediante el uso de cebadores específicos. Consideramos que el conocimiento general de dichos métodos de detección de eventos no es suficiente para afectar el nivel inventivo del método reivindicado.

Finalmente, deseamos resaltar que patentes con similar alcance al de la presente invención han sido concedidas en Estados Unidos, Ucrania, Nueva Zelanda, Australia, Rusia y República de Corea.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Del señor director,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1.- Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9.

2.- Una molécula cebadora polinucleotídica de ADN que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 3, o su complemento que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento MON89788 definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1, 2,3,4 o 9.

3.- Una molécula cebadora polinucleotídica de ADN aislada que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 4, o su complemento que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento MON89788 definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9.

4.- Un equipo de detección de ADN específico para el evento MON89788 definido mediante las secuencias SEQ: 1,2,3,4 o 9 que comprende al menos un ácido nucleico que comprende 11 o más nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

5.- Un método para detectar la presencia de ADN correspondiente al evento MON89788 de soya definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9 en una muestra, el método comprendiendo: (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de soya con un conjunto de cebadores, que cuando se usan

en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento MON89788 de soya definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9, produce un amplicón diagnóstico para el evento MON89788 de soya definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9; y

(b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo el amplicón diagnóstico; y (c) detectar el amplicón diagnóstico.

6.- Un método para detectar la presencia de un ácido nucleico correspondiente al evento MON89788 definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9 en una muestra, el método comprendiendo: (a) obtener una muestra de ADN de soya; y (b) analizar la muestra para la presencia de una secuencia de ADN del evento MON89788 definido mediante las secuencias SEQ ID NOs: 1,2,3,4 o 9.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque el análisis de la muestra de ADN comprende la detección de la presencia de la secuencia de ácido nucleico de al menos una de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o sus complementos.

haplotype C8W6H5 and the relative affect of these haplotypes measured as illustrated in Table 2. This represents the predicted population change in mean value for the trait listed if the haplotype was fixed in the germplasm, everything else staying the same.

5

Example 3

Comparison of the yield of glyphosate tolerant soybeans events having mapped T-type genomic regions relative to the parent line conversion with 40-3-2 transgene insert.

The inventors of the present invention have discovered that a line comprising the
10 19788 T-type genomic region in its genome has an improved yield than the line
comprising the previous 40-3-2 T-type genomic region. This was demonstrated in
replicated field trials including yield data collected from seventeen locations in the
United States. A3244 (US5,659,114, ATCC 97549) is an elite soybean germplasm from
Asgrow (Monsanto, St Louis, MO) that was used as the parent line for transformation to
15 generate the new glyphosate tolerant soybean events 17194, 17426, 19703, and 19788.
For the purpose of comparison the A3244 was converted to glyphosate tolerance by line
conversion with a line containing the 40-3-2 T-type genomic region to produce
A3244RR. The results of the yield study showed that A3244RR yielded an average of
60.7 bu/acre, 19788 an average of 65.6 bu/acre, 19703 an average of 65.7 bu/acre, 17426
20 an average of 65.3 bu/acre, and 17194 an average of 65.8 bu/acre. The four new lines
have an approximate yield advantage of 5 bu/acre over the same genotype with the
introgressed 40-3-2 T-type genomic region (A3244RR). The increase in yield of the
lines with the four new events over the 40-3-2 T-type genomic region is due in part to
haplotype 5 identified in Table 2.

25 This result demonstrates that the haplotype genome region associated with
transgene insertions have measurable phenotypic effects on the lines in which they are
introgressed. In particular, the lines with events 17194, 17426, 19703 and 19788 are
improved with respect to yield over the 40-3-2 event. The haplotype regions associated
with each of the T-type genomic regions of these events have their own value in the
30 soybean germplasm and in a soybean breeding program.

Example 4

Use of glyphosate for disease control with soybean event MON19788. The present invention provides a method for preventing a disease in a soybean plant comprising identifying a soybean plant as being at risk of disease caused by a pathogen, the soybean plant identified as event MON19788 comprising haplotype 1 in a T-type genomic region, the transgene of the region encodes a polypeptide that confers plant tolerance to glyphosate; and applying a composition having glyphosate to the soybean plant, whereby the disease is prevented in the soybean plant.

Application of glyphosate compositions to foliage of plants is preferably accomplished by spraying, using any conventional means for spraying liquids, such as spray nozzles or spinning-disk atomizers. Compositions of the present invention can be used in precision farming techniques, in which apparatus is employed to vary the amount of exogenous chemical substance applied to different parts of a field, depending on variables such as the particular plant species present, plant growth stage, soil moisture status, etc. In one aspect of such techniques, a global positioning system operated with the spraying apparatus can be used to control application of the composition in desired amounts to different parts of a field.

A glyphosate composition is preferably dilute enough to be readily sprayed using standard agricultural spray equipment. Suitable application rates for the present invention vary depending upon a number of factors, including the type and concentration of active ingredient and the plant species involved. Useful rates for applying an aqueous composition to a field of foliage can range from about 25 to about 1,000 liters per hectare (l/ha), preferably about 50 to about 300 l/ha, by spray application.

A deposit of Monsanto Technology LLC, soybean seed 19788 disclosed above and recited in the claims, has been made under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. The ATCC accession number is PTA-xxxx. The deposit will be maintained in the depository for a period of 30 years, or 5 years after the last request, or for the effective

in the name of MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

For: Soybean event MON89788 and methods for detection thereof

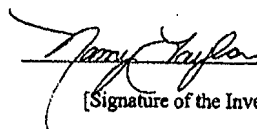
DECLARATION OF NANCY TAYLOR

By this declaration, I, Nancy Taylor, hereby attest to the following:

1. That I am an inventor of the above-captioned patent application, the ownership of which is assigned to Monsanto Technology, LLC.
2. That I worked to create transgenic event MON89788.
3. That I have reviewed and am familiar with the document titled "MON89788 Event Selection Process", filed concurrently with this Declaration. It is my recollection and understanding that this document accurately reflects the creation and selection of the MON89788 Event.

In witness thereof, I sign this affidavit in St. Louis, Missouri USA, this
24th day of February of two thousand and twelve.

Date: 2/24/2012


[Signature of the Inventor]

NOTARIAL CERTIFICATE

UNITED STATES OF AMERICA)

STATE OF MISSOURI) SS.

COUNTY OF ST. LOUIS)

In St. Louis, Missouri, United States of America, on February 24, 2012, before me Notary Public personally appeared Nancy Taylor, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person who subscribed to the within instrument and its Schedule A titled "MON89788 Event Selection Process" hereto, and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity of inventor of the MON89788 Event proprietary of Monsanto Technology LLC, and that by her signature on the instrument Nancy Taylor, employee of Monsanto Company, executed the instrument.

Gracie L. Williams

Notary Public



Notarial Seal)

GRACIE L. WILLIAMS
My Commission Expires
July 8, 2013
St. Louis County
Commission #09403322

MON89788 Event Selection Process

This is a brief summary of the event selection process for the MON89788 event. Summarized is the production and analysis of thousands of soybean plants representing hundreds of individual events over six years through the rigorous molecular, phenotypic, and field tests that were required for the ultimate selection of the commercial soybean event MON89788.

Expression Cassette Selection

At the beginning of this project, little was known about how to achieve optimal CP4-EPSPS transgene expression in transgenic soybean plants. A first-generation Roundup Ready® soybean event, 40-3-2, had already been produced and was commercially available. The challenge was to produce a second-generation Roundup Ready soybean event with superior properties. In order to produce such an event, studies were first required to identify transformation methods, genetic elements, and expression cassette configurations that would be useful for achieving optimal CP4-EPSPS transgene expression in transgenic soybean. To do this, 32 different plant transformation vectors were constructed for testing *in planta*. These 32 vectors contained different combinations of two different chloroplast transit peptides (CTP), two different CP4-EPSPS coding sequences (native or codon-optimized), and 32 different enhancer/promoter/leader/intron expression-regulation elements as well as double- and single-transgene expression cassette configurations. The 32 vectors were each an individual, unique combination of genetic elements and expression cassette configuration.

Event Generation

Transgenic soybean events were then produced from the 32 different plant transformation vectors in four separate transformation phases. Transformation was into the elite soybean germplasm Asgrow soybean variety A3244.

In Phase I, seven vectors were used for transformation. Each of the seven vectors had different combinations of two different CTP elements with two different CP4-EPSPS coding sequences as double- and single-transgene expression cassette configurations. Two different transformation methods, particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation, were also tested.

In Phase II, Phase III, and Phase IV, twenty-five vectors were used for transformation. The twenty-five vectors varied by the expression-regulation elements driving the expression of the CP4-EPSPS coding sequence, e.g., leaders, promoters, enhancers, and/or introns. The same CTP and codon-optimized CP4-EPSPS coding sequence was used in all 25 constructs and *Agrobacterium*-mediated transformation methods were used.

Initial Event Screening and Selection

Following transformation, several thousand explants were generated for each of the individual vectors. Shoots, each representing an individual transformation event, were generated from the explants. For example, for 21 of the vectors data are presented in Table 2 showing the number of explants and shoots produced for each vector. Transformation efficiency, i.e. the number of shoots produced per total number of explants produced, ranged from 0.24% to 2.43%.

Over 900 R0 plants were grown from the shoots and tested for insert copy number. Each R0 plant was tested by TaqMan® analysis to select for events with one or two insert copies as highest priority for advancement. The R0 plants were selfed and plants that set seed were then advanced (see Table 1).

R1 seed from approximately 500 events was collected and planted for greenhouse analysis including phenotypic analysis, glyphosate vegetative tolerance testing, and leaf sampling for biochemical and molecular analysis. The R1 event plants were sprayed at the V1 stage with glyphosate at a rate of 1.5 lb ae/acre to determine vegetative tolerance. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to determine the level of CP4-EPSPS expression in each R1 event. The CP4-EPSPS ELISA analysis was used to select three positive and three negative (isoline) events for further analysis in field trials for each event advanced. Molecular analysis at R1 also included TaqMan analysis to determine zygosity/copy number and polymerase chain reaction (PCR) analysis to determine the intactness of the insert.

Using the vegetative glyphosate tolerance greenhouse testing, phenotypic analysis, and molecular characterization, from the initial 500 independent R1 events, 158 events were selected for advancement to first year field trials.

First year field trials

First year field trials were conducted with 158 independent R2 events. For each event, 3 homozygous and 3 negative isolines were tested. For each event, one field location was used for seed increase only. A second field location was used to determine vegetative and reproductive glyphosate tolerance. For this assessment, the events were planted in a split plot design, 2 row plots per entry (5 feet) and one replication. The spray regimen included these three treatments: [1] Unsprayed; [2] Glyphosate at 0.75 lb acid equivalence (ae)/acre at stage V1 followed by (fb) glyphosate at 1.5 lb ae/acre at stage R1 (flowering); and [3] Glyphosate at 0.75 lb ae/acre at stage V1 followed by (fb) glyphosate at 3.0 lb ae/acre at stage R1 (flowering). (Label rate for glyphosate is a maximum single application of 1.5 lb ae/acre and maximum in crop use not to exceed a total of 2.25 lb ae/acre.) Field observations for glyphosate tolerance included percent chlorosis and percent necrosis at 5, 14, and 30 days after treatment (DAT) and pod set. Agronomic observations taken during R2 field trials were seedling vigor, percent emergence, plant height, lodging, maturity, and yield. In addition to the phenotypic and tolerance measures from the R2 field trials, biochemical and molecular analyses were performed on each event. Western blot analysis of extracts prepared from leaf and seed was performed to confirm correct processing of the CP4-EPSPS protein. Southern blot analysis was performed to confirm single copy insert and to check for absence of vector backbone. Events were also assessed for normal pod set (*i.e.* equal to the commercial comparator), no phenotypic effects due to glyphosate spray (*i.e.* chlorosis, necrosis, growth reduction), no obvious agronomic issues, normal segregation, and single versus double cassette.

The field, molecular, and biochemical data for each of the R2 events were analyzed and used to select 28 events from the original 158 R2 events for advancement to second year field trials.

Second year field trials

Field trials were conducted with 28 R3 events to assess agronomic performance and trait efficacy. A split plot design was used, with a 2 row plot per entry (12 feet), 9 entries (6 events

and 3 positive (40-3-2) controls, 2 replications. The glyphosate treatments included: [1] No treatment, [2] 0.75 lb ae/acre at V3 fb 0.75 lb ae/acre at R1, [3] 1.5 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R1, and [4] 1.5 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R4 (pod set). Field observations for glyphosate tolerance included percent chlorosis and percent necrosis at 5, 14, and 30 days after treatment (DAT) and pod set. Agronomic observations taken during R3 field trials were seedling vigor, percent emergence, plant height, lodging, maturity and yield. Detailed biochemical and molecular analyses were conducted on events that passed vegetative and reproductive glyphosate tolerance criteria. Western blot analysis of extracts prepared from leaf and seed was used to assess correct processing of the CP4-EPSPS protein. Quantitative ELISA was used to measure the CP4-EPSPS expression level. Southern blot analysis was used to confirm single insert and single copy of the CP4-EPSPS cassette, absence of backbone, 3' UTR, and promoter intactness. PCR analysis was done to determine 5' and 3' flanking sequence at the insertion site.

A second glyphosate tolerance R3 field trial was conducted on a subset of the R3 events. These efficacy trials were conducted using a split plot design, at 4 locations with 2 row plot per entry (15 feet), 4 replications. The glyphosate treatments included: [1] No treatment, [2] 1.5 lb ae/acre at V1 fb 1.5 lb ae/acre at R1, [3] 2.25 lb ae/acre at V1 fb 2.25 lb ae/acre at R1, [4] 3.0 lb ae/acre at V1 fb 3.0 lb ae/acre at R1 (pod set), and [5] 3.0 lb ae/acre at R4. Field observations included percent chlorosis and percent necrosis at 5, 14, and 30 days after treatment (DAT) and pod set. Agronomic observations taken during R3 field trials were seedling vigor, percent emergence, flowering date, maturity date, plant height, lodging, shattering, seed moisture at harvest, and yield.

The agronomic and efficacy field trial data and the molecular and biochemical data were analyzed and used to select five events (representing 2 constructs) for advancement from the original 28 R3 events. Of these five events, four lead events were then chosen for third year field testing.

Third year field trials

Agronomic field trials were conducted using the four lead events at 25 locations, which gave a 75% confidence to detect 5% yield difference at alpha 0.05. One location was dropped due to harvesting error. The four events plus their negative isolines, the parental variety, and commercial check (event 40-3-2) were included in the trials. The trial design was split plot with 2 replications, the plots were 2 rows (12 foot) with approx 8 seeds planted/row foot. Since these were agronomic trials, there was no glyphosate spray. Production and management practices were similar to those predominantly in the geographic area in which each trial was grown. Plots were managed aggressively for pest control. Plots were maintained weed free. The data collected included seedling vigor, percent emergence, flowering date, maturity date, plant height, lodging, shattering, seed moisture at harvest, and yield.

Herbicide tolerance field trials were conducted using the four lead events at 19 locations (75% confidence to detect 5% yield difference at alpha 0.05). The glyphosate (Roundup UltraMAX™) treatments included: [1] No treatment, [2] 1.5 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R1, [3] 3.0 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R1, [4] 1.5 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R4, and [5] 3.0 lb ae/acre at V3 fb 3.0 lb ae/acre at R1 fb 3.0 lb ae/acre at R4. The trial design was split plot with 2 replications, the plots were 2 rows (12 foot) with approx 8 seeds planted/row foot. Phenotypic data which was collected included seedling vigor, percent emergence, flowering date, maturity date, plant height, lodging, shattering, seed moisture at harvest, and yield. Based on phenotypic

response (chlorosis and necrosis made at 7, 14, and 21 DAT) the response of the events to glyphosate spray was similar to commercial checks. At several locations, R1 and R4 glyphosate spray induced some "yellow flash" across all entries. Yield at all glyphosate treatments for all events tested in R4 field testing was equivalent to untreated control. In total, there were over 1000 total observations taken for both chlorosis and necrosis in these R4 efficacy field trials, and of these $\geq 92\%$ of the observations were at a level of $<10\%$ chlorosis or necrosis, which was not a statistical difference.

Detailed molecular analysis of the four lead events was conducted and included southern blot analysis to determine insert number and copy number, absence of backbone and cassette intactness, and complete cassette insert sequence analysis, flanking sequence analysis, and northern blot analysis for RNA transcript (CP4). ELISA analysis showed stable CP4-EPSPS expression in numerous tissues (leaf and seed) at various stages (V3, R1, R4, and maturity) tested throughout the growing season.

Based on R4 agronomic and efficacy field trials and molecular analysis for the four lead events, two events (MON89788 and one backup event) were advanced for regulatory work and trait introgression.

Subsequent analysis confirmed that the MON89788 event showed no agronomic differences compared to the negative isoline and to the parental line and no significant difference in 3 out of 4 off-label glyphosate treatments at 17 of the 19 locations tested. The MON89788 event also had a clean molecular profile. Using the multi-year, multi-location field testing data and the extensive molecular analysis results, the MON89788 event was selected as the lead event based on its superior phenotypic characteristics and the characteristics of the inserted genetic material.

Comparison of the MON89788 event with the 40-3-2 event

The MON89788 event was created as a second-generation glyphosate-tolerant soybean to provide enhanced yield potential relative to the first-generation product, event 40-3-2. Although the MON89788 event produces the same CP4-EPSPS protein as the 40-3-2 event, the MON89788 event is a distinct and unique event with superior properties. The insert DNA in the MON89788 event is different from the insert DNA in the 40-3-2 event. The genomic location of the insert is also different between these two events. Field experiments with MON89788 were conducted in 2001 to 2005 throughout the U.S. soybean growing regions. Results from multisite field trials during 2004-05 demonstrated that MON89788 could produce up to 7% more soybean seed than Roundup Ready soybean (event 40-3-2) in similar genetic background and grown under similar environmental conditions and management. In comparison, the U.S. soybean yield increase averaged 0.4 bushels per acre per year according to regional yield trends from 1960 to 2004 (USDA-ERS, 2005). This increase in yield is equivalent to 1% yield gain per year based on national average of 40 bushels per acre. Therefore, using varieties containing MON89788 is likely to enhance soybean yields and provide more economic benefits to the growers compared with using event 40-3-2. In addition, MON89788 is equivalent to Roundup Ready soybean in its tolerance to Roundup herbicide under the current label rate, which will provide the same weed control benefits as the Roundup Ready soybean.

	Vector	E-P-L-I	CTP	CP4-EPSPS	# R0	# R1 Vegetative Spray	# R2 Reproductive Spray	# R3	#R4
Phase I	1	A	b	N	38	34	8	0	
	2	B	a	CO	52	30	4	0	
	3	C	b	N	54	54	26	0	
	4	D	a	N	21	21	0	0	
	5	E	a,a	CO,CO	48	25	7	3	3
	6	F	a,a	CO,CO	19	9	2	0	
	7	G	a,b	N,CO	35	35	9	0	
Phase II	8	H	a	CO	5	1	0	0	
	9	I	a	CO	29	29	0	0	
	10	J	a	CO	56	52	7	0	
	11	K	a	CO	8	7	2	1	
	12	L	a	CO	10	7	0	0	
	13	MON89788	a	CO	72	72	41	21	2
Phase III	14	M	a	CO	5	3	0	0	
	15	N	a	CO	124	43	4	3	
	16	O	a	CO	1	0	0	0	
	17	P	a	CO	19	10	5		
	18	Q	a	CO	21	5	0	0	
	19	R	a	CO	55	27	2	0	
	20	S	a	CO	23	5	0	0	
	21	T	a	CO	41	26	10		
	22	U	a	CO	12	5			
	23	V	a	CO	40	10			
	24	W	a	CO	11	6	4		
Phase IV	25	X	a	CO	30	24	15		
	26	Y	a	CO	14	5			
	27	Z	a	CO	8	0			
	28	AA	a	CO	0	0			
	29	BB	a	CO	17	19	12		
	30	CC	a	CO	10				
	31	DD	a	CO	22				
	32	EE	a	CO	14				

Table 1: The number of events tested at each stage of the event selection process through R4 testing are given for each of the 32 vectors tested. The Phase of transformation is noted on the left side. The expression-regulation elements (E-P-L-I), chloroplast transit peptide (CTP), and CP4-EPSPS version (Native (N) or Codon Optimized (CO)) are noted for each vector.

Vector	E-P-L-I	Explants	Shoots	TE
3	C	11594	56	0.48%
1	A	13405	38	0.28%
8	H	2959	7	0.24%
9	I	7029	20	0.28%
10	J	3437	61	1.77%
14	M	3092	5	0.16%
2	B	15691	64	0.34%
11	K	10603	27	0.25%
12	L	3125	8	0.26%
4	D	2826	22	0.78%
5	E	2422	26	1.07%
6	F	9680	19	0.20%
7	G	2478	35	1.41%
17	P	5903	26	0.44%
13	MON89788	9545	109	1.14%
15	N	16148	130	0.80%
23	V	5911	144	2.43%
18	Q	5842	21	0.36%
20	S	6245	26	0.42%
21	T	5746	97	1.69%
19	R	5891	60	1.02%

Table 2: The number of explants and shoots produced for 21 of the expression-regulation elements (E-P-L-I) tested from Table 1 are provided. Explants are the number of total explants produced from transformation; Shoots are the number of events which were transferred for growth from the explants; TE is the transformation efficiency.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

AS. 122.325

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite
☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante												
Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒												
MONSANTO TECHNOLOGY LLC												
Nómbre o denominación / Nombre o razón social												
Nombre representante legal												
Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☒												
Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____												
<table><tr><td>Nacionalidad/País de constitución</td><td>Dirección y domicilio del titular</td><td>Ciudad</td></tr><tr><td>Estados Unidos de América</td><td>800 North Lindbergh Boulevard, MO 63167</td><td>St. Louis</td></tr><tr><td>Dirección electrónica</td><td>No. Fax</td><td>Número telefónico</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>	Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad	Estados Unidos de América	800 North Lindbergh Boulevard, MO 63167	St. Louis	Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico			
Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad										
Estados Unidos de América	800 North Lindbergh Boulevard, MO 63167	St. Louis										
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico										

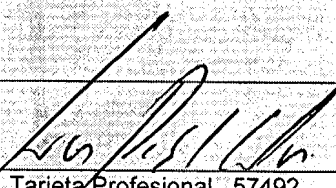
☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:		
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO	80.410.337	57492
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
Dirección y domicilio		
Calle 70 A #4-41		Ciudad
		Bogotá, D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
	742-2200	744-2200
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____		

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 07 136.194	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos
Comprobante de pago No. <u>12-91322</u> Fecha: <u>24.09.12</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	
Tarjeta Profesional 57492	

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0091322

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2012 - 17:16:21

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	91267	05/09/2012		13.700.400.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	447749610	04/09/2012	39.404.600.00

*** Conceptos Pagados ***

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

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

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

**EVENTO MON89788 DE SOYA Y METODOS PARA LA DETECCION DEL
MISMO**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud Provisional U.S. No. 60/685,584, presentada el 27 de mayo de 2005, cuya descripción total es incorporada por tanto para referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un evento de transformación de soya transgénica novedoso y distintivo, designado como MON89788, un cultivo de soya derivado de éste, y partes vegetales, semillas y productos del mismo. La invención también se refiere a ensayos para detectar la presencia de una molécula de ADN específica para MON89788 en un extracto de parte de la planta o extracto de la semilla.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La soya (*Glycine max*) es un cultivo importante en muchas áreas del mundo. Los métodos de biotecnología se han aplicado a la soya para el mejoramiento de las características agronómicas y la calidad del producto. Una de dicha característica agronómica importante en la producción de soya es la tolerancia a herbicida, en particular, tolerancia al herbicida de glifosato. Un evento de soya tolerante a herbicida puede ser una característica útil para el manejo de malezas.

N-fosfonometilglicina, también conocida como glifosato, es un herbicida bien conocido que tiene actividad en amplio espectro de especies vegetales. Glifosato es el ingrediente activo de Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO), un herbicida seguro que tiene una vida media deseablemente corta en el ambiente. Cuando se aplica a una superficie vegetal, el glifosato se mueve sistémicamente a través de la planta. Glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la trayectoria de ácido shikímico, que provee un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimato sintasa (EPSPS) encontrada en las plantas.

La tolerancia a glifosato se puede lograr por medio de la expresión de variantes de EPSPS que tienen afinidad más baja para glifosato y por tanto retienen su actividad catalítica en presencia de glifosato (Patente de E.U.A. Nos. 5,633,435; 5,094,945; 4,535,060 y 6,040,497). Las enzimas que degradan glifosato en tejidos vegetales (Patente de E.U.A. No. 5,463,175) también tienen la capacidad de conferir tolerancia celular a glifosato. Dichos genes se usan para la producción de cultivos transgénicos que sean tolerantes a glifosato, permitiendo de este modo que se use glifosato para el control efectivo de la maleza con una mínima consecuencia en el daño del cultivo. Por ejemplo, la tolerancia a glifosato se ha diseñado genéticamente en maíz (Patente de E.U.A. No. 5,554,798), trigo (Patente de E.U.A. No. 6,689,880), algodón (Patente de E.U.A. No. 6,740,488), soya (WO 9200377) y canola (Solicitud de Patente US 20040018518). Los transgenes para tolerancia a glifosato y los transgenes para tolerancia a otros herbicidas, por ejemplo, el gen bar (Toki et al., 1992; Thompson et al., 1987; fosfinotricina acetiltransferasa (DeBlock et al., 1987), para tolerancia a herbicida de glufosinato) también son útiles como marcadores que se pueden seleccionar o marcadores que se pueden marcar y pueden proveer un fenotipo útil para la selección de plantas enlazadas con otras características agronómicamente útiles.

La expresión de genes extraños en plantas se sabe que es influenciada por su posición cromosomal, probablemente debido a la estructura de cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., 1988). Por esta razón, a veces es necesario seleccionar un número grande de eventos con el fin de identificar un evento caracterizado por expresión óptima de un gen introducido de interés. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede existir una variación amplia en niveles de expresión de un gen introducido entre eventos. También pueden existir diferencias en patrones espaciales o temporales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgen en varios tejidos vegetales, que no pueden corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción génica introducida. Por esta razón, es común producir cientos a miles de diferentes eventos y seleccionar aquellos eventos para un evento sencillo que tiene niveles de expresión transgénica deseados y patrones para propósitos comerciales. Un evento que tiene niveles deseados o patrones deseados de expresión transgénica es útil para introgresión del transgen en otros fondos genéticos por medio de

cruzamiento de distinto tipo pero de la misma raza sexual usando métodos convencionales de reproducción. La progenie de dichas cruzas mantiene las características de expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar una expresión génica confiable en un número de variedades que se adaptan bien a condiciones locales de crecimiento.

Podría ser conveniente tener la capacidad de detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de una craza sexual contiene un transgen de interés. Además, un método para detectar un evento particular podría ser útil para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación pre-mercado y etiquetado de alimentos derivados de plantas de cultivo recombinante, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgen por cualquier método de detección de ácido polinucleico bien conocido tal como la reacción de cadena polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas de ácido polinucleico. Estos métodos de detección generalmente se enfocan en los elementos genéticos frecuentemente usados, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etc. Como un resultado, dichos métodos no pueden ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos usando la misma construcción de ADN a menos que la secuencia de ADN cromosomal ("ADN de flanco") adyacente al ADN transgénico insertado se conozca. Se discute un ensayo de PCR específico del evento, por ejemplo, por Windels et al. (1999), que identificó el evento 40-3-2 de soya tolerante a glifosato por PCR usando un conjunto de cebadores que expanden la unión entre el transgen inserto y ADN de flanco, específicamente un cebador que incluye una secuencia desde el inserto y un segundo cebador que incluye una secuencia del ADN de flanco. Los métodos de detección de ADN específico del evento de planta transgénica se han descrito también en la Patente de E.U.A. Nos. 6,893,826; 6,825,400; 6,740,488; 6,733,974 y 6,689,880; 6,900,014 y 6,818,807, incorporadas aquí para referencia de manera íntegra.

Esta invención se refiere al evento MON89788 de soya tolerante a glifosato (también referido como MON19788 o GM_A19788) y a las moléculas de ADN contenidas en estas plantas de soya que son útiles en los métodos de detección para la planta y su progenie y tejidos de planta derivados del MON89788.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee un evento transgénico de soya designado como MON89788 (también referido como MON19788) y su progenie que tiene semilla representativa depositada con Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con No. de acceso No. PTA-6708. Otro aspecto de la invención son las células vegetales o partes regenerables de la planta y semillas del evento MON89788 de soya. La invención también incluye partes de plantas del evento, pero no se limita a una célula, polen, óvulo, flores, brotes, raíces, hojas, y productos derivados de MON89788, por ejemplo alimento, harina y aceite de soya.

Un aspecto de la invención provee composiciones y métodos para detectar la presencia de un ADN transgénico/región de unión genómica de un evento MON89788 de soya, planta o semilla o productos derivados de partes de plantas o semilla. Las moléculas de ADN se proveen comprendiendo al menos una molécula de ADN transgénico/de unión genómica seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y sus complementos, en donde la molécula de unión extiende el sitio de inserción que comprende un ADN heterólogo insertado en el genoma de la célula de soya y el ADN genómico de la célula de soya que flanquea el evento MON89788 de soya en sitio de inserción. Dichas secuencias de unión pueden, en un aspecto de la invención, definirse como comprendiendo nucleótidos 1093-1113 o 5396-5416 de SEQ ID NO: 9, respectivamente. En otros aspectos de la invención, las uniones se pueden definir como incluyendo porciones adicionales del genoma de flanqueo y transgen, por ejemplo, y se pueden definir como comprendiendo una o más secuencias según se proporciona por los nucleótidos 1073-1113, 1043-1113, 1093-1133, 1093-1163, 1043-1163, 5376-5416, 5346-5416, 5396-5436, 5396-5416, 5396-5466, o 5346-5466 de SEQ ID NO: 9. Dichas secuencias y plantas y semillas que comprenden estas secuencias por tanto forman un aspecto de la invención.

Se provee una molécula de ADN novedosa que es un transgen de ADN/región genómica SEQ ID NO: 3 o su complemento, del evento MON89788 de soya. Una planta y semilla de soya que comprenden SEQ ID NO: 3 en su genoma es un aspecto de esta invención. SEQ ID NO: 3 comprende además SEQ ID NO: 1 de manera íntegra.

De acuerdo a otro aspecto de la invención, se provee una molécula de ADN que es un transgen de ADN/región genómica SEQ ID NO: 4, o su complemento, en donde esta molécula de ADN es novedosa en el evento

MON89788 de soya. Una planta y semilla de soya que comprenden SEQ ID NO: 4 en su genoma es un aspecto de esta invención. SEQ ID NO: 4 comprende además SEQ ID NO: 2 de manera íntegra.

De acuerdo a otro aspecto de la invención, dos moléculas de ácido nucleico se proveen para usarse en un método de detección de ADN, en donde la primera molécula de ácido nucleico comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de ADN de SEQ ID NO: 3 y el segundo ácido nucleico es una molécula de longitud similar de cualquier porción de una región de ADN genómico de soya de flanco 5' de SEQ ID NO: 3, en donde estas moléculas de ácido nucleico cuando se usan en conjunto son útiles como cebadores en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando estos cebadores en el método de amplificación de ADN es diagnóstico para el ADN del evento MON89788 de soya. El amplicón producido por los cebadores descritos que es homólogo o complementario a una porción de SEQ ID NO: 3 que comprende SEQ ID NO: 1 es un aspecto de la invención.

Se proveen de acuerdo a otro aspecto de la invención, dos moléculas de ácido nucleico para usarse en un método de detección de ADN, en donde la primera molécula de ácido nucleico comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de ADN de SEQ ID NO: 4 y una segunda molécula de ácido nucleico de longitud similar de cualquier porción de ADN genómico de soya de flanco 3' de SEQ ID NO: 4, en donde estas moléculas de ácido nucleico cuando se usan en conjunto son útiles como cebadores en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando estos cebadores en el método de amplificación de ADN es diagnóstico para el ADN del evento MON89788. El amplicón producido por los cebadores descritos que es homólogo o complementario a una porción de SEQ ID NO: 4 que comprende SEQ ID NO: 2 es un aspecto de la invención.

Cualquier par cebador de ácido nucleico derivado de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 9 o sus complementos, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para el tejido derivado del evento MON89788 de soya, tal como un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o cualquier porción de SEQ ID NO: 9, respectivamente, es otra modalidad de la invención. En una modalidad particular, el par cebador puede consistir de cebador A (SEQ ID NO: 5) y cebador D (SEQ ID NO: 8).

Otro aspecto de la invención es una planta de soya, o semilla o producto derivado de una planta o semilla que comprende el evento MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Otro aspecto todavía de la invención es una planta de soya, o semilla, o producto derivado de una planta o semilla que comprende MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, en donde las moléculas de cebador de ADN SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se usan en el método de amplificación de ADN.

Aún otro aspecto de la invención es una planta de soya, semilla, producto, o mercancía derivada de la planta o semilla, que comprende MON89788, en donde el ADN genómico cuando se aísla de la planta de soya, o semilla, o producto produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, en donde las moléculas de cebador de ADN SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 se usan en el método de amplificación de ADN. El producto o mercancía puede comprender, sin limitación, un alimento o producto alimenticio que comprende o se deriva de uno o más de los siguientes productos de una planta de soya que comprende el evento MON89788: lecitina, ácidos grasos, glicerol, esteroles, aceite comestible, hojuelas de soya desengrasada, alimentos de soya incluyendo alimentos de soya desengrasados y tostados, leche de soya cuajada, tofu, harina de soya, concentrado de proteína de soya, proteína de soya aislada, proteína vegetal hidrolizada, proteína de soya texturizada, y fibra de proteína de soya.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, un método para detectar la presencia de ADN correspondiente específicamente al ADN del evento MON89788 de soya en una muestra se proporciona. Dicho método comprendiendo: (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN con un par cebador de ADN; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo el amplicón, y (c) detectar el amplicón, en donde dicho amplicón comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Un equipo que comprende moléculas cebadoras de ADN que cuando se usa en un método de amplificación de ADN produce un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 es un aspecto adicional de la invención.

De acuerdo a otro aspecto de la invención, un método para detectar la presencia de ADN que corresponde específicamente al ADN del evento

MON89788 de soya en una muestra se proporciona. Dicho método comprendiendo: (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN con una sonda que hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico del evento MON89788 de soya y no hibrida bajo las condiciones de hibridación rigurosas con un ADN de planta de soya de control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN del evento MON89788 de soya, en donde dicha sonda comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La muestra puede comprender una semilla de progenie, planta, o parte de la planta que comprende el evento MON89788 de soya, o cualquiera de los siguientes productos derivados de una planta que comprende MON89788: lecitina, ácidos grasos, glicerol, esteroles, aceite comestible, hojuelas de soya desengrasada, alimentos de soya incluyendo alimentos de soya desengrasados y tostados, leche de soya cuajada, tofu, harina de soya, concentrado de proteína de soya, proteína de soya aislada, proteína vegetal hidrolizada, proteína de soya texturizada, y fibra de proteína de soya. Un equipo que comprende una sonda de ADN que comprende una molécula de ADN que es homóloga o complementaria a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, es un aspecto de la invención. Un equipo que comprende una molécula de ADN que comprende SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, o sus complementos, también es un aspecto de la invención.

De acuerdo a otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una planta de soya que tolera una aplicación de glifosato que comprende las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera planta de soya tolerante a glifosato parental que comprende el evento MON89788, y una segunda planta de soya parental que carece de tolerancia a glifosato, produciendo de este modo una pluralidad de plantas de progenie; y (b) seleccionar una planta de progenie que tolera la aplicación de glifosato. Los métodos de reproducción pueden comprender adicionalmente las etapas de cruzar la planta parental que comprende el evento MON89788 de soya a una segunda planta de soya parental que también es tolerante a glifosato y seleccionar la progenie tolerante a glifosato por medio de ADN marcador molecular enlazado de manera genética al fenotipo tolerante a glifosato encontrado en cada madre.

Otro aspecto de la invención es un método para controlar las malezas en un campo de plantas de soya que comprenden MON89788, en donde dicho método comprende la plantación de un campo con semilla de soya que comprende el evento MON89788 dicha semilla representativa depositada como

No de acceso ATCC PTA-6708, permitiendo que dicha semilla germine y el tratamiento de dichas plantas con una dosis efectiva de glifosato para controlar el crecimiento de la maleza en dicho campo.

Los aspectos anteriores y otros de la invención serán más aparentes de la siguiente descripción detallada y dibujos anexos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la organización de la inserción transgénica en el genoma de una planta de soya que comprende el evento MON89788.

Las figuras 2A-2B muestran el procesamiento de productos de consumo de soya.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un evento de transformación de soya novedoso designado como MON89788 que provee tolerancia a glifosato, y las partes de la planta y semilla y productos producidos a partir de las plantas, partes de la planta, semillas, y productos que comprenden el evento. La invención provee moléculas de ADN que son novedosas en el genoma de células de soya que comprenden MON89788 y moléculas de ADN que se pueden usar en varios métodos de detección de ADN para identificar el ADN de MON89788 en una muestra. La invención provee un método para controlar malezas en un campo de plantas que contienen MON89788 al tratar las malezas en el campo que comprende plantas que comprenden el evento MON89788 con un herbicida glifosato.

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y guiar a aquellos con experiencia en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos son para ser entendidos de acuerdo al uso convencional para aquellos con experiencia en la técnica relevante. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al. (1991) y Lewin (1994). La nomenclatura para bases de ADN se exponen en 37CFR§ 1.822, se usa.

Como se usa en la presente, el término "soya" se refiere a glicina max e incluye todas las variedades de la planta que se pueden procrear con soya.

Como se usa aquí, el término “que comprende” se refiere a “incluyendo pero sin limitarse a”.

“Glifosato” se refiere a N-fosfonometilglicina y sus sales, glifosato es el ingrediente activo de herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Tratamientos con “herbicida glifosato” se refieren a tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación de herbicida que contiene glifosato. Ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin restricción, aquellas comercializadas por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todos lo cuales contienen glifosato como sus sal isopropilamonio; ROUNDUP®, WEATHERMAX (sal de potasio glifosato), aquellos comercializadas por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; que se comercializa por Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio; y que se comercializa por Syngenta Crop Protection como el herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal trimetilsulfonio. El tratamiento de un campo que comprende plantas de soya tolerantes a glifosato que comprenden el evento MON89788 con cualquiera de estas formulaciones de herbicida de glifosato controlaran el crecimiento de la maleza en el campo y no afectan el crecimiento o rendimiento de las plantas de soya que comprenden MON89788.

Un “evento” transgénico se produce por la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgen de interés, regeneración de una población de plantas que resulta de la inserción del transgen en el genoma de la planta, y selección de una planta particular caracterizada por medio de la inserción en un sitio de genoma particular. El término “evento” se refiere al transformante original y progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “evento” también se refiere a la progenie producida por un cruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN transgénico heterólogo y el ADN genómico de flaqueo. El término “evento” también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y secuencia genómica de flaqueo inmediatamente adyacente al ADN insertado que podría esperarse se transfiera a una progenie que recibe ADN insertado incluyendo el transgen de interés como el resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado

(por ejemplo, el transformante original y progenie que resultan de auto-polinización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Una planta de soya tolerante a glifosato se puede procrear por medio de un primer cruce sexualmente de una primera planta de soya parental que consta de una planta de soya que se desarrolla de una planta de soya tolerante a glifosato transgénica que comprende MON89788 o una planta de soya que es una progenie de la cruce de dicha planta que expresa el fenotipo tolerante a glifosato, y una segunda planta de soya parental que carece de tolerancia a glifosato, produciendo de este modo una pluralidad de primeras plantas de progenie; y después la selección de una planta de progenie que es tolerante a la aplicación de herbicida de glifosato. Estas etapas pueden incluir además el retro-cruzamiento de la planta de progenie tolerante a glifosato a la segunda planta de soya parental o una tercera planta de soya parental, después la selección de la progenie mediante la aplicación con glifosato o por medio de identificación con marcadores moleculares asociados con la característica produciendo de este modo una planta de soya que tolera la aplicación de herbicida glifosato. Los marcadores moleculares se pueden usar comprendiendo las moléculas de ADN de unión identificadas en los sitios 5' y 3' de inserción del transgen en el evento MON89788.

También se entiende que dos diferentes plantas transgénicas se pueden aparear también para producir descendencia que contiene dos transgenes exógenos de segregación independientemente. El retro-cruce a una planta parental y un cruzamiento de distinto tipo pero de la misma raza con una planta no transgénica como se describió previamente también se contempla, como es la propagación vegetativa. Descripciones de otros métodos de procreación que son comúnmente usados para diferentes características y cultivos se pueden encontrar en una de las varias referencias, por ejemplo, Fehr, (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al cual se une una etiqueta detectable convencional o molécula reportera, por ejemplo, un isótopo radioactivo, un ligando, un agente quimio-luminiscente, o una enzima. Dicha sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una cadena de ADN genómico de una planta de soya que comprende el evento MON89788 ya sea de una planta de soya o semilla o de una muestra o extracto de la planta o semilla que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo a la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleico o ribonucleico, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN objetivo y se pueden usar para detectar

la presencia de aquella secuencia de ADN objetivo.

“Cebadores” son ácidos polinucleicos aislados que son fijados a una cadena de ácido polinucleico objetivo complementario por medio de hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ácido polinucleico objetivo, y después se extiende a lo largo de la cadena de ácido polinucleico objetivo por medio de polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebador de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una molécula de ácido polinucleico objetivo, por ejemplo, por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Las sondas y cebadores generalmente son 11 polinucleótidos o más en longitud, preferiblemente 18 polinucleótidos o más, más preferiblemente 24 polinucleótidos o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores hibridan específicamente a una molécula objetivo bajo condiciones de hibridación muy rigurosas. Preferiblemente, las sondas y cebadores de acuerdo a la presente invención tienen identidad de secuencia completa con la molécula objetivo, aunque las sondas que difieren de las condiciones severas y que retienen la capacidad para hibridar a secuencias objetivo bajo condiciones muy rigurosas se pueden diseñar por medio de métodos convencionales.

Los métodos para la preparación y uso de las sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1992); e Innis et al. (1990). Los pares PCR-cebador (un conjunto de cebadores) se puede derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, al usar programas de computadora destinados para aquel propósito tal como cebador (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y sondas basados en el ADN genómico de flanco y secuencias de inserto descritos aquí (SEQ ID NOs: 1-4 y 9) se pueden usar para confirmar y, si es necesario, corregir las secuencias descritas por métodos convencionales, por ejemplo, al aislar la molécula de ADN correspondiente de un depósito de semilla que comprende MON89788, y determinar la secuencia de ácido nucleico de dichas moléculas. Las moléculas de ADN asociadas adicionales se pueden aislar del genoma de una célula que comprende MON89788 que comprende el inserto transgénico y regiones de flanco genómicas, y fragmentos de estas moléculas se pueden usar como cebadores o sondas.

Las sondas y cebadores de ácido nucleico de la presente invención hibridan bajo condiciones rigurosas a una secuencia de ADN objetivo. Cualquier

método de hibridación o amplificación de ácido nucleico convencional se puede usar para identificar la presencia de ADN del evento MON89788 en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos tienen la capacidad de hibridar específicamente a otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Como se usa aquí, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente a otra si las dos moléculas tienen la capacidad de formar una estructura de ácido nucleico de doble cadena, anti-paralela y son de suficiente longitud para mantener esta estructura bajo condiciones muy rigurosas. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si exhiben complementariedad completa. Como se usa en la presente, se dice que las moléculas exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementaria a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "complementarias como mínimo" si pueden hibridar a otra con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan fijas entre sí bajo al menos condiciones "poco rigurosas" convencionales. Similarmente, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar a otra con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan fijas entre sí bajo condiciones "muy rigurosas" convencionales. Condiciones de rigurosidad convencional se describen por Sambrook et al., 1989, y por Haymes et al. (1985). Salidas de complementariedad completa son por tanto permisibles, en tanto dichas salidas no eviten completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble cadena. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o sonda necesita únicamente ser complementaria de manera suficiente en la secuencia para tener la capacidad de formar una estructura estable de doble cadena bajo el solvente particular y concentraciones de sal empleadas.

Como se usa en la presente, una secuencia homóloga sustancialmente es una secuencia de ácido nucleico que específicamente hibridará al complemento de la secuencia de ácido nucleico a la cual se está comparando bajo condiciones muy rigurosas. Condiciones de rigurosidad apropiada que promueven hibridación de ADN, por ejemplo, 6.0 x cloruro de sodio/ citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de 2.0 x SSC a 50°C, se conocen por aquellos con experiencia en la técnica o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de poco rigurosa de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C a muy

rigurosa de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede incrementar desde condiciones poco rigurosas a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones muy rigurosas a aproximadamente 65°C. Ambas la temperatura y la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de la sal se pueden mantener constantes mientras la otra variable se cambia. En una modalidad preferida, un ácido nucleico de la presente invención específicamente hibridará a una o más moléculas de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NOs: 1-4, y 9, sus complementos o fragmentos de cualquiera bajo condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2.0 x SSC y aproximadamente 65°C. En una modalidad particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NOs: 1-4, y 9, sus complementos o fragmentos de cualquiera bajo condiciones muy rigurosas. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comprende la secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o sus complementos o fragmentos de cualquiera. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte entre el 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o sus complementos o fragmentos de cualquiera. Moléculas de ADN marcadoras moleculares que comprenden SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o sus complementos o fragmentos de cualquiera se puede usar como marcadores en métodos de procreación de plantas para identificar la progenie de cruces genéticos similares a los métodos descritos para análisis de marcador de ADN de repetición de secuencia simple, en Cregan et al. (1997); todas las cuales se incorporan aquí para referencia en su totalidad. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN objetivo se puede detectar por cualquier número de métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, estos pueden incluir, pero sin limitarse a: etiquetas fluorescentes, etiquetas radioactivas, etiquetas basadas anticuerpo, y etiquetas quimio-luminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, por PCR) usando un par cebador de amplificación particular, "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par cebador hibridice únicamente a la secuencia ácido nucleico objetivo a la cual un cebador que tiene la secuencia tipo salvaje correspondiente (o su complemento) se puede unir y

preferiblemente producir un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

El término “específico para (una secuencia objetivo)” indica que una sonda o cebador hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas solamente a la secuencia objetivo en una muestra que comprende la secuencia objetivo.

Como se usa en la presente, “ADN amplificado” o “amplicón” se refiere al producto de amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico objetivo que es parte de un a plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de soya que resulta de un cruce sexual contiene el evento transgénico MON89788 o si una muestra de soya colectada de un campo comprende MON89788, o un extracto de soya, tal como alimento, harina o aceite comprende MON89788. El ADN extraído de una muestra de tejido vegetal de soya o extracto se puede someter a un método de amplificación de ácido nucleico usando un par cebador que incluye un cebador derivado de la región genómica adyacente al sitio de inserción de ADN transgénico heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN transgénico heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico para la presencia del ADN del evento. El amplicón es de una longitud y tiene una secuencia que también es diagnóstico para el evento. El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada de los pares cebadores más un par base nucleótido, o más aproximadamente cincuenta pares base nucleótido, o más aproximadamente doscientos cincuenta pares base nucleótidos, o más aproximadamente trescientos cincuenta pares base de nucleótidos o más.

Alternativamente, un par cebador se puede derivar de secuencia genómica de flanqueo en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia nucleotídica de inserto completo. Un miembro de un par cebador derivado de la secuencia genómica vegetal se puede localizar a distancia de la molécula de ADN transgénica insertada, esta distancia puede variar de un par base nucleotídico hasta aproximadamente veinte mil pares base nucleotídicos. El uso del término “amplicón” excluye específicamente dímeros cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico se puede realizar por cualquiera de los varios métodos de reacción de amplificación de ácido nucleico conocido en la técnica, incluyendo la reacción de cadena polimerasa (PCR). Una variedad de métodos de amplificación se conocen en la técnica y se describen, inter alia, en la Patente de E.U.A. Nos. 4,683,195 y 4,683,202 y en Innis et al. (1990). Los

métodos de amplificación de PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22kb de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (Cheng et al., 1994). Estos métodos así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN se pueden usar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o secuencia de flaqueo del evento MON89788 de soya y se puede verificar, y corregir si es necesario por medio de amplificación de dichas moléculas del genoma del evento usando cebadores derivados de las secuencias provistas aquí seguido por métodos de secuenciación de ADN estándares aplicados al amplicón PCR o al ADN transgénico/genómico clonado aislado.

El amplicón producido por estos métodos se puede detectar por medio de una pluralidad de técnicas. Uno de dicho método es Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al., 1994) donde un oligonucleótido de ADN se diseña para traslapar tanto la secuencia de ADN genómico de flaqueo adyacente como la secuencia transgénica de ADN insertado. El oligonucleótido se inmoviliza en pozos de una placa de micropozo. Después de PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flaqueo adyacente), un producto PCR de cadena sencilla se puede hibridar al oligonucleótido inmovilizado y servir como una plantilla para una reacción de extensión base sencilla usando un ADN polimerasa y ddNTP específicos etiquetados para la base siguiente esperada. La lectura puede ser fluorescente o con base en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia genómica inserto/flaqueo debido a la amplificación exitosa, hibridación, y extensión de base sencilla.

Otro método es la técnica piro-secuenciación como se describe por Winge (2000). En este método un oligonucleótido se diseña para traslapar el ADN genómico adyacente y la unión de ADN inserto. El oligonucleótido se hibrida a un producto PCR de cadena sencilla de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flaqueo) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfúrilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden DNTP de manera individual y la incorporación resulta en una señal ligera que se mide. Una señal ligera indica la presencia de la secuencia inserto transgénico/flaqueo debido a la amplificación exitosa, hibridación, y extensión sencilla o multi-base.

La polarización de fluorescencia como se describe por Chen et al. (1999) es un método que se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este método se designa un oligonucleótido para traslapar el

flanqueo genómico y la unión de ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida a un producto PCR de cadena sencilla de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómica de flanqueo) y se incuba en presencia de un ADN polimerasa y un ddNTP etiquetado-fluorescente. La extensión de base sencilla resulta en la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia del inserto transgénico/secuencia genómica de flanqueo debido a la amplificación, hibridación, y extensión de base sencilla exitosas.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se entiende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, una sonda de oligonucleótido FRET se diseña para traslapar el flanqueo genómico y la unión de ADN inserto. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN inserto y uno en la secuencia genómica de flanqueo) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET resulta en la escisión y liberación del radical fluorescente a distancia del radical de templado en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica de flanqueo/de inserto transgénico debido a amplificación e hibridación exitosas.

Guías moleculares se han descrito para usarse en detección de secuencia como se describe en Tyangi et al (1996). Brevemente, una sonda de oligonucleótido FRET se designa para traslapar la unión genómica de flanqueo y ADN inserto. La estructura única de la sonda FRET resulta en ésta conteniendo una estructura secundaria que mantienen los radicales fluorescentes y de templado en proximidad cercana. La sonda FRET y cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN inserto y uno en la secuencia genómica de flanqueo) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación de PCR exitosa, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia objetivo resulta en la remoción de la estructura secundaria de la sonda y separación espacial de los radicales fluorescente y de templado. Una señal fluorescente resulta. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica de flanqueo/de inserto transgénica debido a amplificación e hibridación exitosas.

Otros métodos descritos, tales como, micro-fluidos (Publicación de Patente US 2006068398, Patente US No. 6,544,734) proveen métodos y

dispositivos para separar y amplificar muestras de ADN. Colorantes ópticos usados para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicas (WO/05017181). Dispositivos de nanotubo (WO/06024023) que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanopérlas que unen moléculas de ADN específicas y que pueden entonces ser detectadas son útiles para detectar moléculas de ADN de la presente invención.

Los equipos de detección de ADN se pueden desarrollar usando las composiciones descritas en la presente y los métodos descritos o conocidos en la técnica de detección de ADN. Los equipos son útiles para la identificación de ADN del evento de soya en una muestra y se pueden aplicar a métodos para la procreación de plantas de soya que contienen ADN. Los equipos pueden contener cebadores o sondas de ADN que son homólogos o complementarios a SEQ ID NOs:1-4 y 9 o cebadores o sondas de ADN homólogos o complementarios a ADN contenido en los elementos genéticos transgénicos de ADN, estas secuencias de ADN se pueden usar en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. La estructura del ADN de los elementos genéticos transgénicos contenidos en el genoma de soya y que se ilustra en la figura 1 comprende una región genómica 5' del genoma A3244 de soya que flanquea el inserto transgénico, el inserto comprendiendo una porción de la región de borde derecho (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor quimérico FMV/Tsf1 y elementos enlazados relacionados (Patente US 6,660,911; también referido como FMV/E1F1 α) se conecta de manera operable a una secuencia de codificación de péptido tránsito de cloroplasto *Arabidopsis* EPSPS (en adelante referida como CTP2 o TS-AtEPSPS CTP2, patente US 5,633,435, conectada operablemente a un EPSPS resistente a glifosato (en adelante referido como CP4 EPSPS o aroA:CP4, aislado de la cepa CP4 *Agrobacterium tumefaciens* y secuencia de codificación modificada para expresión incrementada en células vegetales, Patente de E.U.A. 5,633,435), conectada operablemente a la región de terminación 3' de 1,5-bisfosfato carboxilasa ribulosa de arveja (en adelante referida como E9 3' o T-Ps.RbcS:E9, Coruzzi et al., (1984), una porción de la región (LB) de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, y la región genómica 3' del genoma A3244 de soya que flanquea el inserto transgénico. Moléculas de ADN útiles como cebadores en métodos de amplificación de ADN se pueden derivar de la secuencia de los elementos genéticos del inserto transgénico contenido en el evento MON89788 de soya. Estas moléculas cebadoras se pueden usar como parte de un conjunto de cebadores que también incluye una

molécula cebadora de ADN derivada del genoma de soya que flanquea el inserto transgénico. El evento MON89788 de soya se produce por medio de transformación de una línea de soya A3224 (Patente US 5,659,114). por medio de un método mediado por *Agrobacterium*, por ejemplo, métodos descritos en las Patentes US 6,384,301 y 7,002,058 (incorporada aquí para referencia en su totalidad).

Los inventores de la presente invención han descubierto que una línea de soya que comprende la región genómica tipo T MON89788 (tipo T es una combinación de un transgen y la región haplotipo asociada de un genoma vegetal) en su genoma tiene un rendimiento mejorado relativo a una línea que comprende la región genómica tipo T 40-3-2 previa. Esto se demuestra en los ensayos de campo replicados que incluyen datos de rendimiento colectados de locaciones múltiples en los Estados Unidos (solicitud de patente US 60/685584).

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de ciertas modalidades de la invención. Se podrá apreciar por aquellos con experiencia en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan enfoques que los inventores han encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención, y de este modo se pueden considerar que constituyen ejemplos de modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos con experiencia en la técnica podrán, en vista de la presente descripción, apreciar que muchos cambios se pueden realizar en las modalidades específicas que se describen y obtener todavía un resultado similar o parecido sin desviarse de la esencia y alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Producción de amplicón diagnóstico para ADN genómico MON89788

ADN del evento MON89788 de soya transgénica se extrae de tejido que comprende semillas de soya, tejido vegetativo, o alimento. El ADN se aísla del tejido usando un Equipo Miniprep PLant DNeasy de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen Corp. Valencia, CA).

Se produce un producto PCR que comprende una porción del ADN genómico que flanquea el extremo 5' de la inserción de ADN-T (ADN de transferencia que comprende el transgen) en el genoma de una planta que

comprende MON89788. Este producto de ADN comprende SEQ ID NO: 3. PCR se puede realizar usando un cebador designado para hibridar a las secuencias de ADN genómico que flanquean el extremo 3' del inserto transgénico (cebador A de ADN, SEQ ID NO: 5; ver la figura 1) que forma par con un segundo cebador (cebador B de ADN, SEQ ID NO: 6) localizado en la región promotora transgénica (Patente US 6,660,911, SEQ ID NO: 28, incorporada aquí para referencia y encontrada dentro de SEQ ID NO:9).

Se produce un producto PCR del extremo 3' del inserto transgénico que comprende una porción del ADN genómico que flanquea el extremo 3' de la inserción de ADN-T en el genoma de una planta que comprende MON89788. Este producto de ADN comprende SEQ ID NO: 4. PCR se puede realizar usando un cebador designado para hibridar a las secuencias de ADN genómico que flanquean el extremo 3' del inserto de cada evento (cebador D de ADN, SEQ ID NO: 8) y forma par con un segundo cebador (cebador de ADN C, SEQ ID NO: 7) localizado en la secuencia de terminación de transcripción T-Ps.RbcS:E9 3' en el extremo 3' del inserto.

La plantilla PCR incluye ~50 ng de ADN genómico. Como un control negativo ~50 ng de ADN genómico del cultivo de soya no transgénica se utiliza. Cada reacción PCR contiene 5 µl 10 X regulador de pH para REDAccutag™ LA ADN Polimerasa Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 200 µM de cada dNTP (Sigma-Aldrich), 0.4 µM de cada cebador, y 2.5 Unidades de JumpStart™ REDTaq™ ADN Polimerasa (Sigma-Aldrich) en una reacción con volumen total de 50 µl. Las reacciones PCR se llevan a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclación; 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos (min); 32 o 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos (s), 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos o 1 minuto; 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

Se usan los pares de cebadores del evento de ADN para producir un amplicón diagnóstico para ADN genómico MON89788. Estos pares cebadores del evento incluyen, pero no se limitan a cebadores A y B (SEQ ID NO: 5 y 6) y pares C y D de cebadores del evento (SEQ ID NO: 7 y 8), que se usan en el método de amplificación de ADN descrito. Además de estos pares cebadores, cualquier par cebador derivado de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o los complementos de estos, que cuando se usan en una reacción de amplificación de ADN produce un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 diagnóstico para el tejido derivado del evento MON89788 de soya, respectivamente, se puede utilizar. Las condiciones de amplificación de ADN ilustradas en el cuadro 1 y cuadro 2 se

pueden usar para producir un amplicón diagnóstico para MON89788 usando los pares de cebador de evento apropiados. Cualquier modificación de estos métodos usados para producir un amplicón diagnóstico para MON89788 se encuentra dentro de la experiencia ordinaria de la técnica. Un extracto que contiene putativamente ADN de una planta o semilla de soya que comprende MON89788, o un producto derivado de una planta que comprende MON89788 que cuando se analiza en un método de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para el evento de soya MON89788 se puede utilizar como una plantilla para la amplificación para determinar si está presente MON89788.

El amplicón es producido por el uso de al menos una secuencia cebadora derivada de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que cuando se usa en un método PCR produce un amplicón diagnóstico para el evento MON89788. Por ejemplo, la producción de los amplicones MON89788 se puede realizar usando un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient como se muestra en el cuadro 2, o por métodos y aparatos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

CUADRO 1
Procedimiento PCR y condiciones de mezclado de reacción para la
identificación de inserto transgénico/región de unión genómica 5' MON89788
de soya

Etapas	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Agregar a volumen final de 20 µl	-
2	Regulador de pH de reacción 10X (con MgCl ₂)	2.0 µl	Concentración final 1X de regulador de pH, 1.5 mM concentración final de MgCl ₂
3	Solución 10 mM de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0.4 µl	Concentración final 200 µM de cada dNTP
4	Cebador A del evento (SEQ ID NO: 5 re-suspendido en regulador de pH TE 1X o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0.2 µl	Concentración final 0.1 µM
5	Cebador B del evento (SEQ ID NO: 6 re-suspendido en regulador de pH TE 1X o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0.2 µl	Concentración final 0.1 µM

Etapa	reactivo	cantidad	Comentarios
6	RNasa, DNasa libre (500 µg/ml)	0.1 µl	50 ng/reacción
7	REDTaq ADN polimerasa (1 unidad/µl)	1.0 µl (recomendado para cambiar pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
8	ADN extraído (plantilla): - muestras a ser analizadas: *hojas individuales *hojas agrupadas (máximo de 10 hojas/grupo) - control negativo -control negativo -control positivo	- 10-200 ng de ADN genómico -200 ng de ADN genómico 50 ng de ADN genómico de soya no transgénico ADN no plantilla (solución en donde ADN se resuspende) 50 ng de ADN genómico de soya que comprende MON89788	-

Si se necesita mezclado suave (sin calentar la parte superior en el termociclador), agregar 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción. Proceder con el PCR en un Strategene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJR-Biorad, Hercules, CA), Perkin Elmer 9700 (Perkin-Elmer, Boeston, NA), o Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) usando los siguientes parámetros de ciclación (cuadro 2). El termociclador MJ Engine o Eppendorf Mastercycler Gradient se debe correr en el modo calculado. Se corre el termociclador Perkin-Elmer 9700 con una velocidad en rampa establecida en máximo.

CUADRO 2
Condiciones del termociclador

No de ciclo	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutos
34	94°C 1 minuto
	64°C 1 minuto
	72°C 1 minuto y 30 segundos
1	72°C 10 minutos
No de ciclo	Ajustes: Engine MJ o Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutos
34	94°C 30 segundos
	64°C 30 segundos
	72°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos
No de ciclo	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutos
34	94°C 15 segundos
	64°C 15 segundos
	72°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos

EJEMPLO 2
Determinación de secuencia de región transgénica/genómica y análisis
Southern

La secuenciación de ADN de los productos PCR provistos para ADN que se puede usar para diseñar moléculas de ADN adicionales como cebadores y sondas para la identificación de plantas de soya o semillas que comprenden MON89788. Los productos PCR de los tamaños esperados que representan las secuencias transgénicas/genómicas 5' y 3' se aíslan por medio de separación de los productos PCR en un gel de agarosa 2.0% por medio de electrofóresis. Los productos PCR se aíslan incluyendo las regiones ADN 5' y 3' que extienden la unión de inserto entre la inserción transgénica en el genoma de soya. Los productos PCR 5'y 3' para MON89788 se purifican por medio de electrofóresis de gel de agarosa seguido por aislamiento de la matriz de agarosa usando el equipo de extracción de gel QIAquick (catálogo # 28704, Quiagen Inc., Valencia, CA). Los productos PCR purificados entonces se secuencian (por ejemplo, ABI Prism™

377, PE Biosystems, Foster City, CA) y se analizan (por ejemplo, software de análisis de secuencia DNASTAR Inc., Madison, WI).

Se determina una secuencia de ADN para el segmento par base de nucleótido que representa la región transgénica/genómica del evento MON89788 como se ilustra en la figura 1 y se identifica como SEQ ID NO: 9. los elementos genómicos y transgénicos que están contenidos en SEQ ID NO: 9 se describen en el cuadro 3. Las regiones de flanqueo 5' y 3' están incluidas en SEQ ID NO: 9 y se proporcionan en SEQ ID NOs: 21 y 22.

Las secuencias de unión son moléculas de polinucleótido relativamente cortas que son secuencias de ADN novedosas y son diagnóstico para ADN de MON89788 cuando se detectan en un ensayo de detección de ácido polinucleico. Las secuencias de unión en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 representan 10 polinucleótidos en cada lado de un sitio de inserción del fragmento transgénico y ADN genómico de soya en MON89788. Las secuencias de unión de polinucleótido más largas o más cortas se pueden seleccionar de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Las moléculas de unión (región de unión 5' SEQ ID NO: 1, y región de unión 3' SEQ ID NO: 2) son útiles como sondas de ADN o como moléculas cebadoras de ADN en métodos para la detección de ADN.

Los cebadores y sondas usados en un método Taqman® (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA) para la detección de una molécula de ADN de evento específica se desarrolla para el evento MON89788. Las moléculas cebadoras se refieren como SQ2824 (SEQ ID NO: 10), AQ2826 (SEQ ID NO: 11), SQ1141 (SEQ ID NO: 12), SQ1142 (SEQ ID NO: 13), SQ5543 (SEQ ID NO: 14) y las moléculas de sonda son referidas como PB871-6FAM (SEQ ID NO: 15), PB2191-VIC (SEQ ID NO: 16), y PB57-VIC (SEQ ID NO: 17). Los cebadores y sondas se usan en el método Taqman® de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes para proveer un amplicón diagnóstico para ADN que comprende MON89788. Los tejidos de soya que incluyen productos procesados, por ejemplo alimento, son fuentes útiles de ADN para este método. Los cebadores adicionales usados para producir un amplicón de alimento de soya incluyen SEQ ID NOs: 18-20.

CUADRO 3
Anotación del elemento genómico y genético del fragmento de ADN
transgénico/ genómico (SEQ ID NO: 9) contenido en el genoma de soya que
comprende MON89788

Elemento genético ¹	Locación en secuencia ²	Función (referencia)
Secuencia de flanqueo del extremo 5' del inserto	1-1103	ADN GENOMICO DE SOYA
Región de unión 5'	1093-1113	Región de ADN que expande la inserción transgénica
Borde derecho-B ³	1104-1145	Región de ADN de Agrobacterium tumefaciens que contiene la secuencia borde derecha usada para transferir del ADN-T (Depicker et al., 1982)
Secuencia de intervención	1146-1215	Secuencias usadas en clonación de ADN
P ⁴ -FMV/Tsf1	1216-2255	Promotor quimérico que consta de secuencias incrementadas del promotor 35S del virus del mosaico escrofularia (Richins et al., 1987) y el promotor del gen Tsf1 de Arabidopsis thaliana (que codifica el factor de alargamiento EF-1 alfa (Axelos, et al., 1989)

Elemento genético ¹	Locación en secuencia ²	Función (referencia)
L ⁵ -Tsf1	2256-2301	Líder no traducido 5' (exon 1) del gen Tsf1 de Arabidopsis thaliana que codifica el factor de alargamiento EF-1 alfa (Axelos et al., 1989)
L ⁶ -Tsf1	2302-2923	Intrón del gen Tsf1 de Arabidopsis thaliana que codifica el factor de alargamiento EF-1 alfa (Axelos et al., 1989)
Secuencia de intervención	2924-2932	SECUENCIAS USADAS EN CLONACION DE ADN
TS ⁷ -CTP2	2933-3160	Secuencias que codifican el péptido de tránsito de cloroplasto del gen ShkG de Arabidopsis thaliana que codifica EPSPS (Klee et al., 1987)
CS ⁸ -cp4 epsps	3161-4528	Secuencia de codificación optimizada de codón del gen aroA de la cepa Agrobacterium sp. CP4 que codifica la proteína EPSPS CP4 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 1997)
Secuencia de intervención	4529-4570	Secuencias usadas en la clonación de ADN
T ⁹ -E9	4571-5213	Secuencia no traducida 3' del gen RbcS2 de Pisum sativum que codifica la sub-unidad pequeña Rubisco (Coruzzi et al., 1984)
secuencia de intervención	5214-5256	Secuencias usadas en la clonación de ADN
borde izquierdo -B	5257-5406	Región de ADN de Agrobacterium tumefaciens que contiene la secuencia borde izquierdo usada para transferencia del ADN-T (Backer et al., 1983)

Elemento genético ¹	Locación en secuencia ²	Función (referencia)
Región de unión 3'	5396-5416	Región de ADN que expande la inserción transgénica
Secuencia de flanqueo del extremo 3' del inserto	5407-6466	ADN genómico de soya

Análisis Southern Blot

ADN genómico de una planta que comprende MON89788 y ADN genómico de soya de control (~15 µg de cada uno) se digiere con varias enzimas de restricción (140 U) en un volumen total de 150 µl incluyendo 15µl del regulador de pH del fabricante correspondiente (NEB, Beverly, MA). Las endonucleasas de restricción, por ejemplo, Bgl11, BamH1, Nco1, Hind111, y Bc11, se usan en el análisis Southern de MON89788. Las digestiones de endonucleasa se realizan a la temperatura apropiada por al menos 6 horas. Después de la incubación, el ADN se precipita con acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol. Posteriormente, el ADN se lava con etanol al 70%, se seca, y se resuspende en 40 µl de TBE. Regulador de pH de carga (0.2X) se añade a las muestras y después se somete a electrofóresis en geles de agarosa (0.8%) durante 16-18 horas a 30 volts. Los geles se tiñen con etidio-bromuro, después se tratan con una solución de despurinación (0.125 N HCl) durante 10 minutos, con una solución de desnaturalización (hidróxido de sodio 0.5M, cloruro de sodio 1.5M) durante 30 minutos, y finalmente con una solución de neutralización (base Trizima 0.5 M, cloruro de sodio 1.5M) durante 30 minutos. El ADN se transfiere a la membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) usando un Turboblotter (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) durante 4-6 horas y después se fija a la membrana usando una luz UV.

Las membranas se pre-hibridan con 20 ml de solución DIG Easy Hyb (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN; No. de cat. 1603558) durante 2-4 horas a 45°C. Las sondas de ADN radiactivas (³²P dCTP) homólogas o complementarias a SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, SEQ o ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, o una porción de las mismas se hace usando un equipo de etiquetado de ADN Radprime (Invitrogen, Carlsbad, CA; No. de cat. 18428-011). Los nucleótidos no incorporados se remueven usando columnas SEPHADEX G-50 (Invitrogen). La solución de pre-hibridación se reemplaza con 10 mls de solución DIG Easy Hyb pre-calentada que contiene la sonda desnaturalizada a una concentración final de 1 millón de conteos por ml. Las manchas se hibridan a 45°C durante 16-18 horas.

Las manchas se lavan con una solución poco severa (5X SSC, 0.1X SDS) a 45°C y después se lava repetidamente con una solución de severidad muy alta (0.1X SSC, 0.1% SDS) a 65°C. Las manchas se exponen a un tamiz de fósforo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por >2 horas y la lectura de exposición usando una máquina Data Storm 860 (Amersham Biosciences). Estos métodos y condiciones ejemplificados pueden ser modificados por aquellos con

experiencia en la técnica de detección de ADN en una muestra.

EJEMPLO 3
Control de maleza

El control del crecimiento de maleza en un campo de soya que comprende MON89788. Un campo se planta con semillas de soya que comprenden MON89788, las semillas se dejan germinar en plantas y el campo de las plantas se trata con una formulación herbicida que contiene glifosato. Una dosis efectiva de una formulación de glifosato a proporciones de tratamiento desde aproximadamente 0.1 kg ae/A (kg de equivalente ácido de glifosato/acre) a 1.36 o más kg ae/A se aplican al campo. Las proporciones aplicadas a veces varían desde aproximadamente 0.34 kg ae/A a 0.68 kg ae/A a una frecuencia de uno o más tratamientos durante la temporada de crecimiento como sea necesario para controlar el crecimiento de maleza en un campo. Las semillas de las plantas que comprenden MON89788 se recolectan de las plantas tratadas.

Un depósito del Monsanto Technology LLC, la semilla de soya representativa del evento MON89788 descrito anteriormente y recitado en las reivindicaciones se ha realizado bajo el Tratado de Budapest con la Colección de Cultivo Tipo Americana (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso ATCC para el depósito que comprende el evento MON89788 (también conocido como MON19788 o GM_A19788) es PTA-6708, depositado el 11 de mayo de 2005. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más duradero, y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, será aparente para aquellos con experiencia en la técnica que la invención se puede modificar en la disposición y detalle sin desviarse de dichos principios. Reclamamos todas las modificaciones que se encuentran dentro de la esencia y alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las publicaciones y documentos de patente publicadas citadas en esta especificación se incorporan aquí para referencia al mismo grado como si cada publicación o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada para referencia.

Referencias

Las siguientes referencias, hasta el punto que provean procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios a aquellos expuestos aquí, se incorporan específicamente en la presente para referencia.

U.S. Patent 4,535,060

U.S. Patent 4,683,195

U.S. Patent 4,683,202

U.S. Patent 5,094,945

U.S. Patent 5,463,175

U.S. Patent 5,554,798

U.S. Patent 5,633,435

U.S. Patent 5,633,435

U.S. Patent 5,659,114

U.S. Patent 6,040,497

U.S. Patent 6,384,301

U.S. Patent 6,544,734

U.S. Patent 6,660,911

U.S. Patent 6,660,911

U.S. Patent 6,689,880

U.S. Patent 6,689,880

U.S. Patent 6,733,974

U.S. Patent 6,740,488

U.S. Patent 6,740,488

U.S. Patent 6,818,807

U.S. Patent 6,825,400

U.S. Patent 6,893,826

U.S. Patent 6,900,014

U.S. Patent 7,002,058

Solicitud U.S. 60/685584

Publicación U.S. 20040018518

Publicación U.S. 2006068398

Ausubel et al, In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1992.

Chen et al., Genome Res., 9:492-498, 1999.

Cheng et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91:5695-5699, 1994.

Coruzzi et al., EMBO J., 3:1671-1679, 1984.

Cregan et al., In: DNA markers: Protocols, applications, and overviews, Wiley-Liss NY, 173-185, 1997.

DeBlock et al, EMBO J., 6:2513-2522, 1987.

Fehr, Ih: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox (Ed.), Amer. Soc. of Agronomy, Madison WI, 1987.

Haymes et al., In: Nucleic acid hybridization, a practical approach, IRL Press, Washington, DC, 1985.

Innis, et al., In: PCR Protocols. A guide to Methods and Application, Academic Press, Inc. San Diego, 1990.

Lewin, In: Genes V, Oxford University Press, NY, 1994.

Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res., 22:4167-4175, 1994.

PCT Appln. WO 9200377

PCT Appln. WO/05017181

Rieger et al., In: Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5* Ed., Springer- Verlag: NY, 1991.

Sambrook et al., hi: Molecular cloning: a laboratory manual, 2<n> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Thompson et al, EMBO J. 6:2519-2523, 1987.

Toki et al, Plant Physiol, 100:1503-1507, 1992.

Tyangi et al, Nature Biotech., 14:303-308, 1996.

Weising et al, Ann. Rev. Genet., 22:421-477, 1988.

Windels et al, Med. Fac. Landbouww, 64/5b:459-462, 1999.

Wingem, Innov. Pharma. Tech., 00:18-24, 2000.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a plantas de soya y semillas que comprenden el evento de transformación MON89788 y moléculas de ADN únicas para estos eventos; la invención también se refiere a métodos para detectar la presencia de estas moléculas de ADN en una muestra.

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1.- Una planta de soya o parte de la misma que comprende el evento MON89788, en donde la semilla de soya representativa que comprende el evento MON89788 se han depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-6708.

2.- Una semilla de la planta de conformidad con la reivindicación 1, en donde la semilla comprende un evento MON89788.

3.- Un producto de consumo soya producido de la semilla de conformidad con la reivindicación 2.

4.- El producto de consumo de soya de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque se define como alimento, harina, hojuelas, o aceite.

5.- El alimento, harina, hojuelas o aceite de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque se define comprendiendo un ácido nucleico que produce un amplicón diagnóstico para el evento MON89788 cuando se analiza en un método de amplificación de ADN, dicho amplicón comprendiendo SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

6.- Un método para producir un producto de consumo de soya que comprende, (a) obtener la planta de soya o parte de la misma de conformidad con la reivindicación 1; y (b) producir un producto de consumo de soya de la planta de soya o parte de la misma.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque el producto de consumo se define como alimento, harina, hojuelas, aislado de proteína, o aceite.

8.- Un método para el control del crecimiento de maleza en un campo que comprende plantas de soya que comprenden el evento MON89788, el método comprendiendo el tratamiento del campo con una cantidad de glifosato efectiva para controlar el crecimiento de la maleza, en donde las plantas de soya exhiben tolerancia al glifosato.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque el tratamiento del campo se realiza desde la etapa V1 a R4 de crecimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Malven, Marianne
Rinehart, Jennifer
Taylor, Nancy
Dickinson, Ellen
- <120> EVENTO MON89788 DE SOYA Y METODOS PARA LA DETECCION DEL MISMO
- <130> MONS:113WO
- <140> DESCONOCIDO
<141> 2006-05-26
- <150> 60/685,584
<150> 2005-05-27
- <160> 22
- <170> 3.3
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(20)
<223> molécula quimérica del genoma y transgene de la soya
- <400> 1
- tatcaagctc caaactga 20
- <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(20)
<223> molécula quimérica de la secuencia genómica y transgene de la soya
- <400> 2
- taataacgct cagacttag 20
- <210> 3
<211> 1222

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(1222)
- <223> molécula quimérica del ADN genómico de soya e inserto transgénico
- <400> 3

cctgtacttc ccaaaacttc gcttcctga cccatcatat ccaggactgg acgattggct 60
tgattgatac cagatgggtg agtcgagtc acctcggtag cggcatttat ggcaacgatt 120
gcagccacgt tgacctccat catTTTTct catgctcatc atggcctcca tcatggtggt 180
catttggctt tcatggcct ccatgtcggc ctcatctgc tcttgaactt catctatctc 240
actcatgatt ctagccttgg cagtggttg gtaagggtac cgtaaagcgc gttcgttctt 300
tttattact atgattacat ttgacgatg atgatgattg taggaaagaa tgaaatgagt 360
aatgaaacaa ctaaataaac gtgaatgcat gacaatgata agttgctgaa gtattataaa 420
ttacatagg acattcagtg gaacgtaggg tcgaatcaaa tcctatttca ttaaaaacaa 480
tattgttcat ctgacagag ccaaagcata actagaaata caacatggac acatcagcga 540
ttcctaatta tgtgggtcat tagttcgacc atgtgttggc agtaactga aagactatga 600
acttcatcgg gagcagagta tgtgtcagtc accgccttgg ctctggctaa caaccttggg 660
atctcttggc tctcatttag agtaagagca aattgtcca tccatttcat ggcttcttta 720
tgcaataact ctatcacccc ttctcttgct tcccttcaa cctgcaaggt cgacactttt 780
gcctgttcgt cttctagcct tcgcccatga ctagcagcta gggtcacctt ctctcatat 840

tggtcaatga ttatcaacat attttctttt gttttgctca actgttctct caaacttctc 900
ttcgatctct gacaactctt taacttatcc tctaacaatca ggttttccat acttgatttg 960
tccctcttgg cttttctaag ttgagctcg ttactgctgc cccacaaagc ccctcgaaac 1020
ttgttcctgc tccactcttc cttttgggct tttttgttc ccgctctagc gtttcaatcg 1080
tggttatcaa gctccaaaca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgac 1140
cccatcaagc tctagctaga gcggccgcgt tatcaagctt ctgcaggctc tgctcgagt 1200
gaagctaatt ctgagctcaa ag 1222

- <210> 4
- <211> 675
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(675)
- <223> molécula de ADN quimérica de ADN genómico de soya e inserto transgénico
- <400> 4

gccaattgat tgacaacatg catcaatcga cctgcagcca ctggaagcgg ccgcatcgat 60
cgtgaagttt ctcatctaag cccccatttg gacgtgaatg tagacacgtc gaaataaaga 120
tttccgaatt agaataattt gtttattgct ttgcctata aatacgacgg atcgtaattt 180
gtcgttttat caaaatgtac ttcatctta taataacgct cagactctag tgactaccac 240
cttcaacttc ctcaagcatt tcagcctctt ccccgctcag actccttagc ttggggagcc 300
aaattatccc ttacgttctc gacttcaacc atatgtgata gctgcctatg ataccatggc 360
tacttcccct tagttcttta tctttccttt ccgctttatt ccatgcctta ccgacctct 420
gaagtgtctt tgcattagct tcattgaaac ctacgcgat gaaaggtgtg atggtctcct 480
ccgatggcgc acttctcata gggtaacctt attgtcttac gaccaacata ggattataat 540
taatacaacc cctcgtccct ataaaaggga catttgaaa tccttcacat aagcataaca 600
ctctacccc tctttcttc cactgtggga accaactaat ggacgctcct atcatgcctg 660
ccaagagttc ttccc 675

- <210> 5

<211> 21
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 5

cctgtacttc ccaaaacttc g 21

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Virus mosaico de escrofularia

<400> 6

ctttccactg agaattagct cc 22

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Petunia hybrida

<400> 7

gccaatgat tgacaacatg catc 24

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 8

gggaagaact cttggcaggc 20

<210> 9
<211> 6466
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(6466)
<223> Molécula de ADN quimérica de ADN genómico de soya e inserto transgénico

<400> 9

tgggggctgc ctgtacttc caaaacttcg cttccctgac ccatcatatc caggactgga 60

cgattggctt gattgatacc agatgggtga gtcgagtcca cctcggtagc ggcatttatg 120
gcaacgattg cagccacgtt gacctccatc atttttctc atgctcatca tggcctccat 180
catggtggtc atttggctt tcatggcctc catgtcggcc ttcattctgt cttgaacttc 240
atctatctca ctcatgattc tagccttggc acgtgttgg taagggtacc gtaaagcgcg 300
ttcgtcttt ttattacta tgattacatt ttgacgatga tgatgattgt aggaaagaat 360
gaaatgagta atgaaacaac taaataaacg tgaatgcatg acaatgataa gttgctgaag 420
tattataaat ttacatagga cattcagtgg aacgtagggc cgaatcaaat cctatttcat 480
taaaaacaat attgttcac ttgacagagc caaagcataa ctagaaatac aacatggaca 540
catcagcgat tcctaattat gtgggtcatt agttcgacca tgtgttgga gtaactgaa 600
agactatgaa cttcatcggg agcagagtat gtgtcagtca ccgccttggc tctggctaac 660
aaccttggga tctcttggct ctcatftaga gtaagagcaa attgtccat ccatttcag 720
gcttctttat gcaataactc tatcaccct tctcttgcct cctttcaac ctgcaaggtc 780
gacactttg cctgttctc ttctagcctt cgcccatgac tagcagctag gttcaccttc 840
tcttcatatt ggtcaatgat tatcaacata tttctttt ttttgcctca ctgttctc 900
aaacttctct tcatctctg acaactctt aactatcct ctaacatcag gttttcata 960
cttgatttgt cctcttggc ttttctaagt ttgagctcgt tactgtgcc ccacaaagcc 1020
cctcgaaact tgttctgt ctactcttc tttgggctt tttgttcc cgctctagcg 1080
ctcaatcgt ggttatcaag ctcaaacac tgatagtfta aactgaaggc gggaaacgac 1140
aatctgatcc ccatcaagct ctgctagag cgcccgctt atcaagcttc tgcaggctc 1200
gctcgagtgg aagctaattc tcagtccaaa gcctcaacaa ggtcagggtg cagagtctcc 1260
aaaccattag ccaaaagcta caggagatca atgaagaatc ttcaatcaaa gtaaactact 1320
gtccagcac atgcatcatg gtcagtaagt ttcagaaaaa gacatccacc gaagacttaa 1380
agttagtggg catcttgaa agtaatctt tcaacatga gcagctggct tgtggggacc 1440
agacaaaaaa ggaatgggc agaattgta ggcgcaccta ccaaaagcat cttgccttt 1500
attgcaaaga taaagcagat tcctctagta caagtgggga acaaaataac gtggaaaaga 1560
gctgtcctga cagcccactc actaatcgt atgacgaacg cagtgcgac cacaaaagaa 1620
ttagcttgag ctcaggattt agcagcattc cagattgggt tcaatcaaca aggtacgagc 1680

catatcactt tattcaaatt ggtatcgcca aaaccaagaa ggaactccca tctcaaagg 1740
tttgaagga agaattcgat atcaagcttg atatcggaag tttctctctt gagggaggtt 1800
gctcgtggaa tgggacacat atggttgta taataaacca ttccattgt catgagattt 1860
tgaggtaat atatacttta ctgttcatt atttatttg gtgttgaat aatgatata 1920
aatggctctt gataatctgc attcattgag atatacaata ttactctag agaagagtgt 1980
catatagatt gatggccac aatcaatgaa attttggga gacgaacatg tataaccatt 2040
tgctgaata accttaatta aaaggtgtga ttaaatgatg tttgaacat gtagtactaa 2100
acattcataa aacacaacca acccaagagg tattgagtat tcacggctaa acaggggcat 2160
aatggtaatt taaagaatga tattatttta tgtaaacc taacattggt ttcggattca 2220
acgtataaa taaaaccact ctggtgctg attccattta tcgttcttat tgaccctagc 2280
cgctacacac tttctgcca tatctctgag gtaagcgta acgtaccctt agatcgttct 2340
tttctttt cgtctgctga tcgttgctca tattatttcg atgattgttg gattcgatgc 2400
tcttggtga ttgatcgttc tgaaaattct gatctgtgtg ttagatttta tcgattgta 2460
atatcaacgt ttactgctt cttaaagata attatcat gaaactattt tccattctg 2520
atcgatcttg tttgagatt ttaatttgt cgattgattg ttggttggtg gatctatata 2580
cgagtgaact tgttgattg cgtatttaag atgtatgtcg attgaattg tgattgggta 2640
attctggagt agcatacaa atccagtgtt ccttttctt aagggttaatt ctcggttgt 2700
ttgcttata tctctgaaa ttgccgattt gattgaattt agctcgctta gctcagatga 2760
tagagcacca caattttgt ggtagaaatc ggttgactc cgatagcggc ttttactat 2820
gattgtttg tgtaaagat gatttcata atggttatat atgtctactg ttttattga 2880
ttcaatattt gattgttctt tttttgcag attgttgac cagagatcta ccatggcgca 2940
agttagcaga atctgcaatg gtgtgcagaa cccatctctt atctccaatc tctcgaaatc 3000
cagtcaacgc aaatctccct tatcggtttc tctgaagacg cagcagcatc cagagctta 3060
tccgatttcg tcgtcgtggg gattgaagaa gagtgggatg acgttaattg gctctgagct 3120
tcgtcctctt aaggcatgt cttctgttc cacggcgtgc atgcttcacg gtgcaagcag 3180
ccgtccagca actgctcgta agtctctggt tctttctgga accgtccgta ttccaggtga 3240
caagtctatc tcccacaggt ccttcatgtt tggaggcttc gctagcgggtg aaactcgtat 3300
caccggtctt ttgaaggtg aagatgttat caacactggt aaggctatgc aagctatggg 3360

tgccagaatc cgtaaggaag gtgatacttg gatcattgat ggtgttggtg acggtggact 3420
ccttgctcct gaggctcctc tcgatttcgg taacgctgca actggttgcc gttgactat 3480
gggtcttgtt ggtgtttacg atttcgatag cactttcatt ggtgacgctt ctctactaa 3540
gcgccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact tcgcgaaatg ggtgtgcagg tgaagtctga 3600
agacggtgat cgtcttcag ttaccttgcg tggaccaaag actccaacgc caatcaccta 3660
cagggtaact atggcttccg ctcaagtga gtccgctgtt ctgcttgctg gtctcaacac 3720
cccaggtaac accactgtta tcgagccaat catgactcgt gaccacactg aaaagatgct 3780
tcaaggtttt ggtgctaacc ttaccgttga gactgatgct gacggtgtgc gtacatccg 3840
tcttgaaggc cgtggttaagc tcaccggtca agtgattgat gttccagggtg atccatcctc 3900
tactgcttcc ccatgggtg ctgccttgct tgtccagggt tccgacgtca ccatccttaa 3960
cgttttgatg aaccaaaccc gtactggtct catcttgact ctgcaggaaa tgggtgccga 4020
catcgaagtg atcaaccac gtcttgctgg tggagaagac gtggctgact tgcgtgttcg 4080
ttctctact ttgaagggtg ttactgttcc agaagaccgt gctccttcta tgatcgacga 4140

gtatccaatt ctgctgttg cagctgcatt cgctgaagg gctaccgtta tgaacggttt 4200
ggaagaactc cgtgttaagg aaagcgaccg tcttctgct gtcgcaaacg gtctcaagct 4260
caacggtgtt gattgcgatg aaggtagagac ttctctcgtc gtgcgtggtc gtctgacgg 4320
taagggctc ggtaacgctt ctggagcagc tgcgctacc cacctcgatc accgtatcgc 4380
tatgagcttc ctggttatgg gtctcgttc tgaaaaccct gttactgttg atgatgctac 4440
tatgatcgct actagcttcc cagagttcat ggattgatg gctggcttg gagctaagat 4500
cgaactctcc gacactaagg ctgcttgatg agtcaagaa ttcgagctcg gtaccggatc 4560
ctctagctag agcttctgtt cgtatcatcg gtttcgacaa cgttcgtcaa gttcaatgca 4620
tcagtttcat tgcgcacaca ccagaatcct actgagtttg agtattatgg cattgggaaa 4680
actgttttc ttgtaccatt tgtgtgctt gtaatttact gtgttttta ttcggtttc 4740
gctatcgaac tgtgaaatgg aaatggatgg agaagagtta atgaatgata tggctcttt 4800
gttcattctc aaattaatat tattgtttt ttctcttatt tgtgtgtgt tgaattgaa 4860
attataagag atatgcaaac atttgtttt gagtaaaaat gtgtcaaac gtggcctcta 4920
atgaccgaag ttaatagag gagtaaaaca ctgtagtgtg taccattatg cttattcact 4980
aggcaacaaa tatattttca gacctagaaa agctgcaa atgtactgaat acaagtatgt 5040
cctcttgtgt ttagacatt tatgaactt cctttatgta atttccaga atccttgtca 5100
gattctaac attgctttat aattatagtt atactcatgg attgtagtt gagtatgaaa 5160
atattttta atgcattta tgacttgcca attgattgac aacatgcac aatcgacctg 5220
cagccactcg aagcggccgc atcgatcgtg aagtttctca tctaagcccc catttgacg 5280
tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagattc cgaattagaa taattgttt attgcttctg 5340
cctataaata cgacggatcg taattgtcg tttatcaaa atgtacttc atttataat 5400
aacgctcaga ctctagtac taccacctc actctctca agcattcag cctcttcccc 5460
gtcagactc ctagctttg ggagccaaat tatcccttac gtctcgact tcaaccatat 5520
gtgatagctg cctatgatac catggctact tccccttagt tctttatct tctttccgc 5580
ttattccat gcctaccga tctctgaag tgccttgca ttagcttcat tgaaacctca 5640
cgcgatgaaa ggtgtgatgg tctctccga tggcgcaatt ccatagggt aacctaatg 5700
tcttacgacc aacataggat tataattaat acaaccctc gtccctataa aaggacatt 5760
tggaaatcct tcacataagc ataactcc taccctctt tcttccact gtgggaacca 5820

actaatggac gctcctatca tgctgccaa gatttctcc caattgcct cgtccttcc 5880
tgagcacatg ccatgacctt gtatgggta gacagatcta cttcatgat tgaagacgtg 5940
ggataccaac cacacataaa gagcaggcgc acaacagaaa atcctcgtag tgctcttctt 6000
gcatcttaag tcaaatgtat catacactta tgctaaaaca acaatgatcg ggcttctt 6060
gctatggta taagcaagaa aagcatgat tgctactaga tccaccaact cgtctacatt 6120
cgaaaatagt actatcccaa aactagcag tgctaatacg tcgatgaatg atcccactc 6180
tccttggtg gccagagttt ccgcctctc ctccaatcac ttcttggtg tccccctac 6240
cctattccta cttgcttca ctactctaa ttctattc gagatctga caactctgc 6300
tattctgcc atagaaggat agtaccaga aaaaaggat ggcttctt ctcctatcg 6360
gcatcctaag atcccttga actccttat ggttggtgct aactgaaagt cccaaaagt 6420
gaagcatctg agtgattgt catagtattg ggtgagagat gcatg 6466

- <210> 10
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> .Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(22)
- <223> molécula iniciadora sintética
- <400> 10

cctttgggc tttttgtt cc 22

- <210> 11
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(20)
- <223> molécula iniciadora sintética
- <400> 11

cgttccgc cttcagttta 20

- <210> 12
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(20)
- <223> molécula iniciadora sintética

- <400> 12

tgtgtggtgt gacccattgg 20

- <210> 13
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(25)
- <223> molécula iniciadora sintética

- <400> 13

cctcaattgg gagatactgc actta 25

- <210> 14
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(29)
- <223> molécula iniciadora sintética

- <400> 14

gtagtcacta gggtcagtaa agaattgtga 29

- <210> 15
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(18)
- <223> molécula iniciadora sintética

<400> 15

ttatcaagct ccaaacac 18

- <210> 16
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(22)
- <223> molécula iniciadora sintética

<400> 16

tgagctcaaa gatatcaaca tg 22

- <210> 17
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(22)
- <223> molécula iniciadora sintética

<400> 17

agttaaataca tagttaataa tc 22

- <210> 18
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(20)
- <223> molécula iniciadora sintética

<400> 18

tcccgctcta gcgcttcaat 20

- <210> 19
- <211> 19
- <212> ADN

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(19)

<223> molécula iniciadora sintética

<400> 19

tcgagcagga cctgcagaa

19

<210> 20

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(24)

<223> molécula iniciadora sintética

<400> 20

ctgaaggcgg gaaacgaca tctg

24

<210> 21

<211> 1103

<212> ADN

<213> Glycine max

<400> 21

tgggggctgc ctgtacttcc caaaacttcg ctccctgac ccatcatatc caggactgga 60
cgattggctt gattgatacc agatgggtga gtcgagtcca cctcggtagc ggcatttatg 120
gcaacgattg cagccacgtt gacctccatc atttttctc atgctcatca tggcctccat 180
catggtggtc atttggcttt tcatggcctc catgtcggcc ttcattgctt ctgaaacttc 240
atctatctca ctcatgattc tagccttggc acgtgtttgg taagggtacc gtaaagcgcg 300
ttcgttcttt ttattacta tgattacatt ttgacgatga tgatgattgt aggaaagaat 360
gaaatgagta atgaaacaac taaataaacg tgaatgcatg acaatgataa gttgctgaag 420
tattataaat ttacatagga cattcagtg gacgtagggg cgaatcaaat cctatttcat 480
taaaaacaat attgttcac ttgacagagc caaagcataa ctgaaatac aacatggaca 540
catcagcgat tcctaattat gtgggtcatt agttcgacca tgtgttggca gtaactgaa 600
agactatgaa ctcatcggg agcagagtat gtgcagtca ccgccttggc tctggctaac 660
aaccttggga tctcttggct ctcatctaga gtaagagcaa attgtccat ccatttcag 720
gcttctttat gcaataactc tatccccct tctcttgcct cctttcaac ctgcaaggtc 780
gacactttt cctgttcgtc ttctagcctt cgcccatgac tagcagctag gttcaccttc 840
tcttcatatt ggtaaatgat tatcaacata ttttctttt ttgtctcaa ctgttcttc 900
aaacttctct tcgatctctg acaactcttt aactatctct ctaacatcag gttttcata 960
cttgatttgt cctcttggc ttttctaagt ttgagctcgt tactgtctcc ccacaaagcc 1020
cctcgaaact tgttctgtct ccactcttcc ttttgggctt tttgtttcc cgctctagcg 1080
cttcaatcgt gggtatcaag ctg

<210> 22
<211> 1060
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 22
cagactctag tgactaccac cttcactctc ctcaagcatt tcagcctctt ccccgcctcag 60
actccttagc ttgggagcc aaattatccc ttacgttctc gacttcaacc atatgtgata 120
gctgcctatg ataccatggc tacttcccct tagttcttta tctttccttt ccgctttatt 180
ccatgcctta ccgatcctct gaagtgtctt tgcattagct tcattgaaac ctcacgcgat 240
gaaagggtgtg atggctctct ccgatggcgc acttctcata gggtaaccta attgtcttac 300
gaccaacata ggattataat taatacaacc cctcgtccct ataaaaggga catttgaaa 360
tccttcacat aagcataaca ctctacccc tctttcttct cactgtggga accaactaat 420
ggacgctcct atcatgcctg ccaagagttc ttccaattt gcctcgtcct ttctgagca 480
catgcgatga ccttgatgg ggtagacaga tctacttca tgattgaaga cgtgggatac 540
caaccacaca taaagagcag gcgcacaaca gaaaatctc gtagtgctct tctgcatct 600
taagtcaaat gtatcataca cttatgctaa aacaacaatg atcgggcttt ccttgctatg 660
gtgataagca agaaaagcat cgattgctac tagatccacc aactcgtcta cattcgaaaa 720
tagtactatc ccaaacta gcagtgctaa tacgtcgatg aatgatgcc actctccttg 780
gctggccaga gttccgcct tctctccaa tcacttctt ggtattcccc ctaccctatt 840
cctactttgc ttactcagt ctaattctca ttctgagatc ttgacaactc ctgctattct 900
cgccatagaa ggatagtacc cagaaaaaag gtatggcttc cttctctta tcgggcatcc 960
taagatccct tcgaactcct ctatggttg tgctaactga aagtcccaa aagtgaagca 1020
tctgagtgat tggcatagt attgggtgag agatcgatg 1060

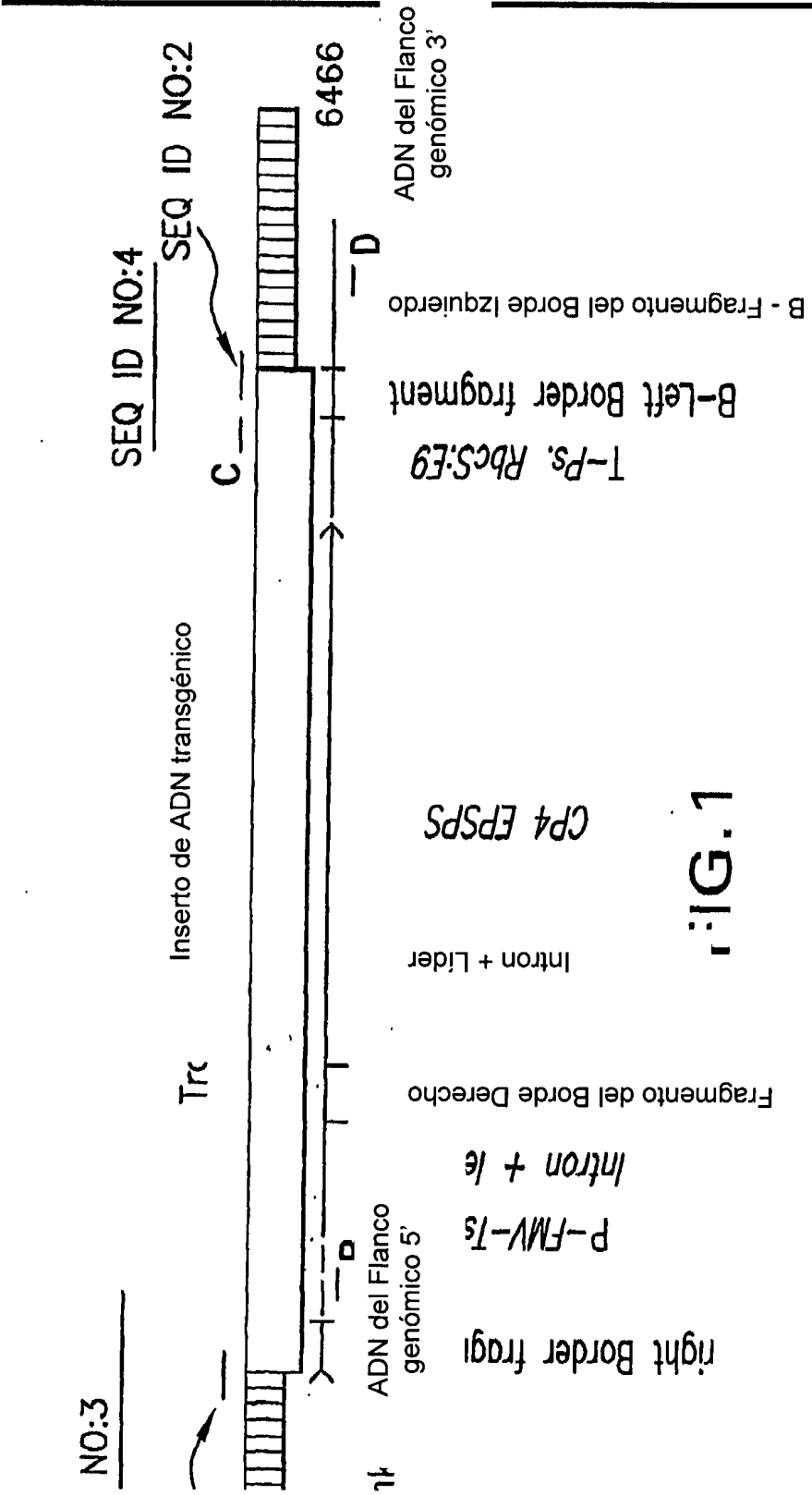
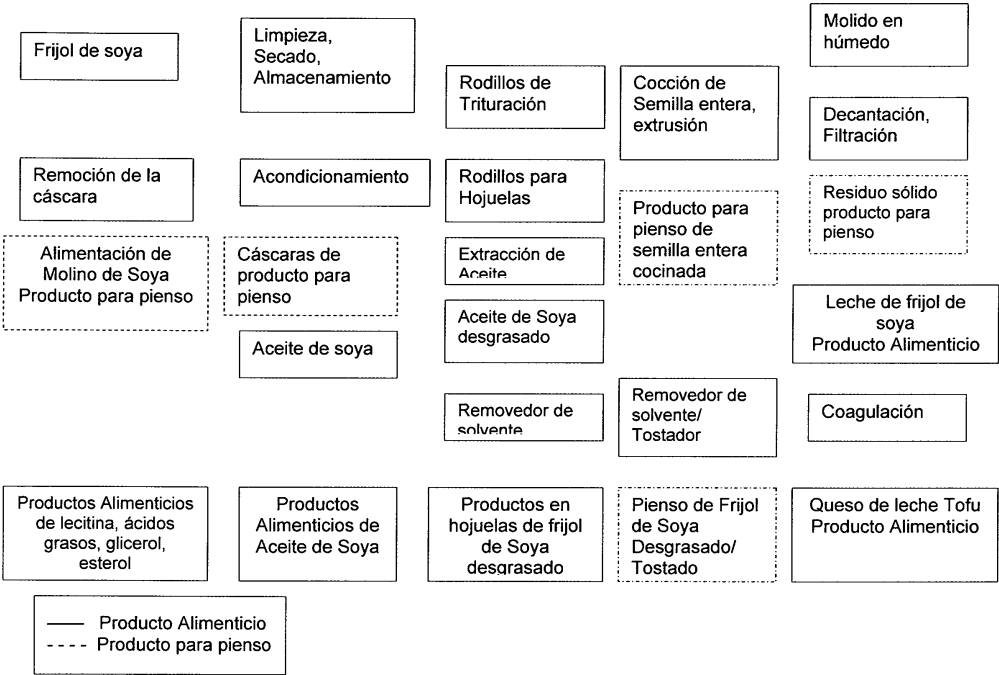
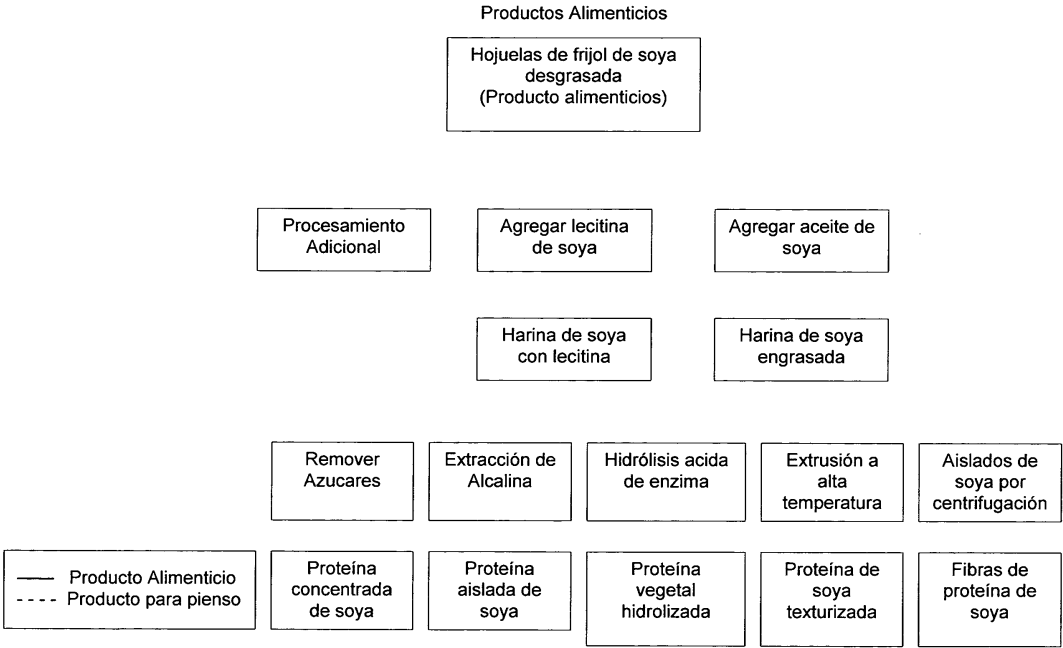


FIG. 1



69



5/10

PODER

El Suscrito.

En calidad de.....

De.....

Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de.....

con domicilio en.....

Nombro(amos) a JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir 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 mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 71-21 Piso 4, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en.....

Hoy.....de.....de..200....

Firma.....

Nombre.....

Cargo.....

POWER OF ATTORNEY

The Undersigned Barbara Bunning-Stevens

Acting as Intellectual Property Counsel

of Monsanto Technology LLC
Company Incorporated as per the laws of Delaware

domiciled in St. Louis, Missouri USA

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile and/or address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciled in Carrera 7 No. 71-21, Piso 4, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

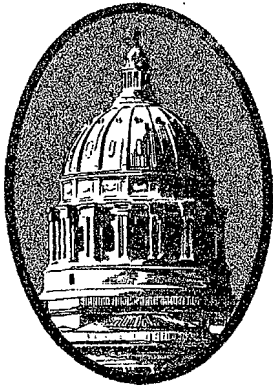
Granted and signed in St. Louis Mo. USA

This 16th day of April of 2008

Signature Barbara Bunning-Stevens

Name Barbara Bunning-Stevens

Title Intellectual Property Counsel



STATE OF MISSOURI

Office of
Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by NICOLE M. ARENDALL

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

4. bears the seal/stamp of NICOLE M. ARENDALL - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 22nd day of APRIL, 2008

7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 188523

9. Seal/Stamp

10. Signature:



Comm. 27 (01-01)

Robin Carnahan
Secretary of State

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

On this 16th day of April of
personally appeared before me Barbara Bunning-Stee

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el
anterior documento, debidamente juramentado declaró y
dijo que él (ella) es

to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument who being by me duly
sworn did depose and say that he (she) is the

Intellectual Property Counsel

de

of

Monsanto Technology LLC

Sociedad legalmente constituida para un período de
duración que aún no ha terminado; que el declarante
está autorizado por dicha compañía para conferir este
poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder,
en nombre y representación de la expresada compañía,
es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro del
objeto social de la sociedad.

Which is legally constituted for a term not yet expired,
that deponent is authorized by said Company to confer
this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto
by the deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that the
purpose for which this instrument is granted is included
within the corporate purpose of company.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las
pruebas de la existencia de la sociedad.

The undersigned Notary Public attests that he has seen
the documents that prove the existence of the
company.

Estado de
con fecha

State of Missouri
under date of April 16, 2008

y que quien confiere el presente poder es su
representante.

and that he (she) who grants the present power of
attorney is its Representative.

Notario Público (sello)



NICOLE M. ARENDALL
My Commission Expires
March 18, 2010
St. Louis County
Commission #06434773

Nicole M. Arendall
Public Notary (Seal)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

Hoy de de , comparecieron)
ante mí

On this day of of
personally appeared before me

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede y
quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los
fines y propósitos que en él se expresan.

who is(are) known to me and who I attest executed the
foregoing document and he (they) declared he (they)
grant(s) the document for the uses and purposes therein
expressed.

Notario Público (sello)

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

73
54

AS:105754



The State of Texas

Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by LUIS M MONTES

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

4. and bears the seal/stamp of LUIS M MONTES, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 10-08-08

CERTIFIED

5. at Austin, Texas 6. on March 19, 2008

7. by the Secretary of State of Texas

8. Certificate No. N-635296

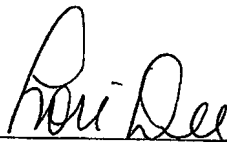
9. Seal 10. Signature:



Phil Wilson

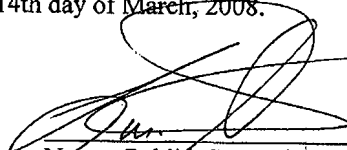
Phil Wilson
Secretary of State
ST/clk

I, Lori Dee, of Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, do hereby declare that the copy attached hereto is a true photocopy of the assignment of United States Patent Application Serial No. 11/441,914, which claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/685,584, and of all divisional, continuing, substitute, renewal, reissue and all other applications for patent which have been or shall be filed in the United States and all foreign countries on any of such improvements; all original and reissued patents which have been or shall be issued in the United States and all foreign countries on such improvements; and specifically including the right to file foreign applications under the provisions of any convention or treaty and claim priority based on such application in the United States

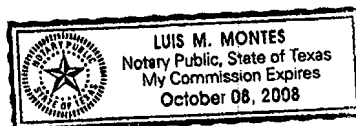


Lori Dee
Paralegal
Sonnenschein Nath & Rosenthal

Subscribed and sworn to before me this 14th day of March, 2008.



Notary Public, State of Texas



74
58

PATENT
FILE NO. MONS:113US

ASSIGNMENT

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

SELL, ASSIGN AND TRANSFER to MONSANTO TECHNOLOGY LLC (the "Assignee"), having a place of business at 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis, Missouri 63167, their entire right, title and interest for the United States and all foreign countries in and to any and all improvements which are disclosed in the application for United States Letters Patent, Serial No. 11/441,914 which has been filed on May 26, 2006 and is entitled "SOYBEAN EVENT MON89788 AND METHODS FOR DETECTION THEREOF," which claims priority to U. S. Provisional Application No. 60/685,584 filed on May 27, 2005, such application and all divisional, continuing, substitute, renewal, reissue and all other applications for patent which have been or shall be filed in the United States and all foreign countries on any of such improvements; all original and reissued patents which have been or shall be issued in the United States and all foreign countries on such improvements; and specifically including the right to file foreign applications under the provisions of any convention or treaty and claim priority based on such application in the United States;

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

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

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

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

Signature: Marianne Malven
Name: Marianne Malven

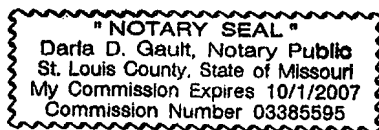
Date: 7-31-06

STATE OF MO
COUNTY OF St. Louis

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 31st day of July, 2006 personally appeared Marianne Malven, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he/she executed the same of his/her own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Darla D. Gault
Notary or Consular Officer

[SEAL]



Signature: Jennifer Rinehart
Name: Jennifer Rinehart

Date: 8/1/06

STATE OF Wisconsin
COUNTY OF Dane

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 1st day of August, 2006 personally appeared Jennifer Rinehart, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he/she executed the same of his/her own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Kim D. Smythe
Notary or Consular Officer

[SEAL]

Signature: _____

Name: Nancy Taylor

Date: 7.31.06

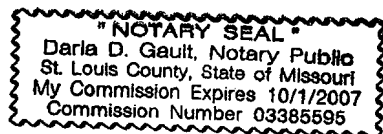
STATE OF _____

COUNTY OF St. Louis

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 31st day of July, 2006 personally appeared Nancy Taylor, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he/she executed the same of his/her own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Darla D. Gault
Notary or Consular Officer

[SEAL]



Signature: Ellen Dickinson Date: 8/1/06
Name: Ellen Dickinson

STATE OF Missouri
COUNTY OF St. Louis

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 1st day of August, 2006 personally appeared Ellen Dickinson, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument and acknowledged to me that he/she executed the same of his/her own free will for the purposes and consideration therein expressed.

Michelle Ludwig
Notary or Consular Officer

[SEAL]



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05560747

FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.
600 Congress Avenue, Suite 2400
Austin, Texas 78701

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de cesión de solicitud de Patente a
MONSANTO TECHNOLOGY LLC, firmado por los cedentes y el cesionario.

El Estado de Texas

Secretario de Estado

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE JULIO DE 1961)

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
LUIS M. MONTES
3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE:
NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE TEXAS
4. LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE:
LUIS M. MONTES, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE TEXAS, LA
COMISIÓN VENCE: 10 DE AGOSTO DE 2008

CERTIFICADO

5. EN AUSTIN, TEXAS
6. EL 19 DE MARZO DE 2008
7. POR EL SECRETARIO DE ESTADO DE TEXAS
8. CERTIFICADO NO. N-635296
9. SELLO
10. FIRMA

HAY UN SELLO QUE DICE:

EL ESTADO DE TEXAS

(FIRMA)

PHIL WILSON
SECRETARIO DE ESTADO
ST/CLK

Yo, Lori Dee, de Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, declaro que la copia anexa al presente es una fotocopia verdadera de la cesión de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con Serie No. 11/441/914, que reclama prioridad de la solicitud provisional en Estados Unidos No. 60/685,584, y todas las solicitudes divisionales, que sean continuación, sustitutas o renovaciones, reexpediciones, y todas las otras solicitudes de patente que han sido o serán presentadas en los Estados Unidos y en todos los demás países de tales mejoras; todas las patentes originales y reexpedidas que han sido o será expedidas en los Estados Unidos y en todos los demás países sobre tales mejoras; y específicamente incluyendo el derecho a presentar solicitudes extranjeras bajo las estipulaciones de cualquier convención o tratado y reivindicar prioridad basada en tal solicitud en los Estados Unidos.

(Firma)
Lori Dee
Paralegal
Sonnenschein Nath & Rosenthal

Suscrito y jurado ante mí este día 14 de marzo de 2008.

(firma)
Notario Público, Estado de Texas
Hay un Sello que Dice:
LUIS M. MONTES
NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE TEXAS
Mi comisión vence
Octubre 8, 2008

CESIÓN

Para la buena y valiosa contraprestación, el recibo, suficiencia y adecuación de la que aquí está reconocida, los abajo firmantes procedemos aquí:

Vendemos, cedemos y transferimos a MONSANTO TECHNOLOGY LLC (el "Cesionario"), con sus oficinas principales en 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis, Missouri 63167, la totalidad del derecho, título e intereses para los Estados Unidos y todos los demás países en y para cualesquier mejoras que sean divulgadas en la solicitud de patente de los estados unidos, Serie No. **117441,914**, que ha sido solicitada el **26 de mayo de 2006** y se titula **EVENTO MON89788 DE SOYA Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DEL MISMO**", el cual reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/685,584, presentada el 27 de mayo de 2005, tal solicitud y todas las divisionales, continuaciones, sustitutas, renovaciones, reexpediciones y todas las demás solicitudes de patente que han sido o serán presentadas en los Estados Unidos y en todos los otros países sobre cualquiera de tales mejoras; y específicamente incluyendo el derecho a presentar solicitudes extranjeras bajo las estipulaciones de cualquier convención o tratado y reivindicar prioridad basada en tal solicitud en los Estados Unidos.

AUTORIZAMOS Y SOLICITAMOS a la autoridad expedidora que expida al cesionario todas las patentes de Estados Unidos y del exterior concedidas sobre tales mejoras;

GARANTIZAMOS Y CONVENIMOS que ninguna cesión, garantía, hipoteca, licencia o cualquier otro acuerdo que afecte los derechos y la propiedad aquí convenidos has sido o será celebrado para terceros por los abajo firmantes, y que el derecho total para convenir lo dicho como se ha expresado aquí está en cabeza de los abajo firmantes.

CONVENIMOS, cuando seamos requeridos y a cargo del cesionario, llevar a cabo de buena fe la intención y propósito de esta cesión, los abajo firmantes ejecutaremos todas las solicitudes de patente divisionales, de continuación, sustitutas, renovaciones, reexpediciones, y todas las solicitudes de patente de cualquiera y de todas esas mejoras; ejecutar todos los juramentos en derecho, las declaraciones, cesiones, poderes y otros documentos; comunicar al cesionario todos los hechos conocidos por los abajo firmantes referidos a tales mejoras y a su historia; y, en general, hacer todo lo posible que el cesionario considere deseable para conceder el título a tales mejoras, y para asegurar, mantener y reforzar la protección adecuada de la patente para tales mejoras;

PARA SER VINCULANTE en los herederos, asignatarios, representantes y sucesores de los abajo firmantes y extenderlo a los sucesores, asignatarios y nombrados del cesionario.

Firma: _____ (Firma) _____ fecha: 31 de julio de 2006
Nombre: Marianne Malven

ESTADO DE MISURI
CONDADO DE SAN LUIS

ANTE MÍ, la autoridad abajo firmante, en este día 31 de julio de 2006, personalmente ante mí compareció Marianne Malven, conocida por mí por ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento siguiente y reconocido por mí que él/ella ejecutó el mismo por su propia voluntad libre para los propósitos y contraprestación aquí expresada.

(Firma) _____
Notario de la Oficina Consular

[SELLO]

Hay un sello que dice:

"SELLO NOTARIAL"
Daria D. Gault, Notario Público
Condado de San Luis, Estado de Missouri
Mi comisión vence el 1° de octubre de 2007
Número de Comisión 03385595

Firma: _____ (Firma) _____ fecha: 1 de agosto de 2006
Nombre: Jennifer Rinehart

ESTADO DE WISCONSIN
CONDADO DE DANE

ANTE MÍ, la autoridad abajo firmante, en este día 1 de agosto de 2006, personalmente ante mí compareció Jennifer Rinehart, conocida por mí por ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento siguiente y reconocido por mí que él/ella ejecutó el mismo por su propia voluntad libre para los propósitos y contraprestación aquí expresada.

(Firma) _____
Notario de la Oficina Consular

[SELLO]

Firma: _____ (Firma) _____ fecha: 31 de julio de 2006
Nombre: Nancy Taylor

ESTADO DE MISURI
CONDADO DE SAN LUIS

ANTE MÍ, la autoridad abajo firmante, en este día 31 de julio de 2006, personalmente ante mí compareció Nancy Taylor, conocida por mí por ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento siguiente y reconocido por mí que él/ella ejecutó el mismo por su propia voluntad libre para los propósitos y contraprestación aquí expresada.

(Firma) _____
Notario de la Oficina Consular

[SELLO]

Hay un sello que dice:

"SELLO NOTARIAL"
Daria D. Gault, Notario Público
Condado de San Luis, Estado de Missouri
Mi comisión vence el 1° de octubre de 2007
Número de Comisión 03385595

Firma: (Firma)
Nombre: Ellen Dickinson

fecha: 1 de agosto de 2006

ESTADO DE MISURI
CONDADO DE SAN LUIS

ANTE MÍ, la autoridad abajo firmante, en este día 1 de agosto de 2006, personalmente ante mí compareció Ellen Dickinson, conocida por mí por ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento siguiente y reconocido por mí que él/ella ejecutó el mismo por su propia voluntad libre para los propósitos y contraprestación aquí expresada.

(Firma)
Notario de la Oficina Consular

[SELLO]

Hay un sello que dice:

SELLO NOTARIAL
NOTARIO PÚBLICO
ESTADO DE MISURI

Hay otro sello que dice:

MICHELLE LUDWIG
Mi comisión vence
El 13 de julio de 2009
Condado de San Luis
Comisión # 05550747

FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.
600 Congress Avenue, Suite 2400
Austin, Texas 78701