Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 2002-49630 2/2

54. **TÍTULO** Planta Cuarta Aleación [illegible] 1598 [illegible]

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A 01H 001/026
C12N 5/00

71. **SOLICITANTE** MONSANTO TECNOLOGY LLC

DOMICILIO St Louis Missouri EEUU

74. **APODERADO** Emilio Ferrero COD 1002

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 2002- 49630 1/2

54. **TÍTULO** Planta Evento Algodón Moni 15985 y composiciones y metodos para deteccion del mismo

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A01H 001/006
C12N 5100

71. **SOLICITANTE** MONSANTO TECHNOLOGY LLC

DOMICILIO St Louis, Missouri, EEUU

74. **APODERADO** Emilio Ferrero
cod. N° 1092

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

FORMA P-10)

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 02-4963

54. **TITULO** PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCION DEL MISMO

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A 01H 001/006
C12N 5/00

71. **SOLICITANTE** MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

DOMICILIO St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América.

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
Código No. 1092

?. **BOGOTA, D. C.**

63

(P-10)

02 02-49630

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

1. **EXPEDIENTE No.** 02-49630

4. **TÍTULO** Planta evento de algodon mon15985 y composiciones y metodos para detección del mismo

. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A 01 H 001/006; C12 N 5/00

. **SOLICITANTE** Monsanto Technology LLC.

DOMICILIO St. Louis, Missouri, Estados Unidos De America

4. **APODERADO** Emilio Ferrero
codigo # 1092

2. **BOGOTÁ, D. C.,**

302038

63/81

ORMA P-10)

X 1

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

02 049630 0

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000000 Folios: 6
Fecha (AMD): 2002-06-11 16:57:58
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENT
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

ción

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC.**
sociedad constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.
Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América.
Teléfono: 546 09 70
E-mail: clientes@camyp.com
Fax: 249 40 70
Domicilio: St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América..

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número: _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)

Nombre: Emilio FERRERO
Dirección: Carrera 4ª No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
E-mail: cavelier@cavelier.com
Fax: 217 92 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número: 438.019 TP 31.929

4 ...ENTOR(ES) (72)

1- **Scott A. HUBER**
681 Hidden Path, Apt. D. Creve Coeur. Missouri 63141.
2- **James K. ROBERTS**
15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, Missouri 63017.
3- **Zachary W. SHAPPLEY**
3597 Waterford Cove South, Collierville, Tennessi 38017.
4- **Sean DOHERTY**
1446 Rankin, Richmond Heights, Missouri 63117
Estados Unidos de América, Respectivamente

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número: _____

5 TITULO (54) PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO.

6 Clasificación Internacional (51) A01H 001/006

7 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US.	11 de junio de 2001	60/297.406

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los WO 02100163

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐

9
Comprobante de pago No 02-34.500 **Fecha:** 27 de mayo de 2002
Comprobante de pago No. 02-33.591 **Fecha:** 23 de mayo de 2002

10

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud $ 378.000.oo
- [ ] Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- [x] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad $ 106.000.oo
- [ ] Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [x] Poderes, si fuere el caso
- [ ] Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- [ ] Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [x] Descripción de la invención
- [x] Una o más reivindicaciones
- [x] Dibujos y/o planos necesarios
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [x] Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

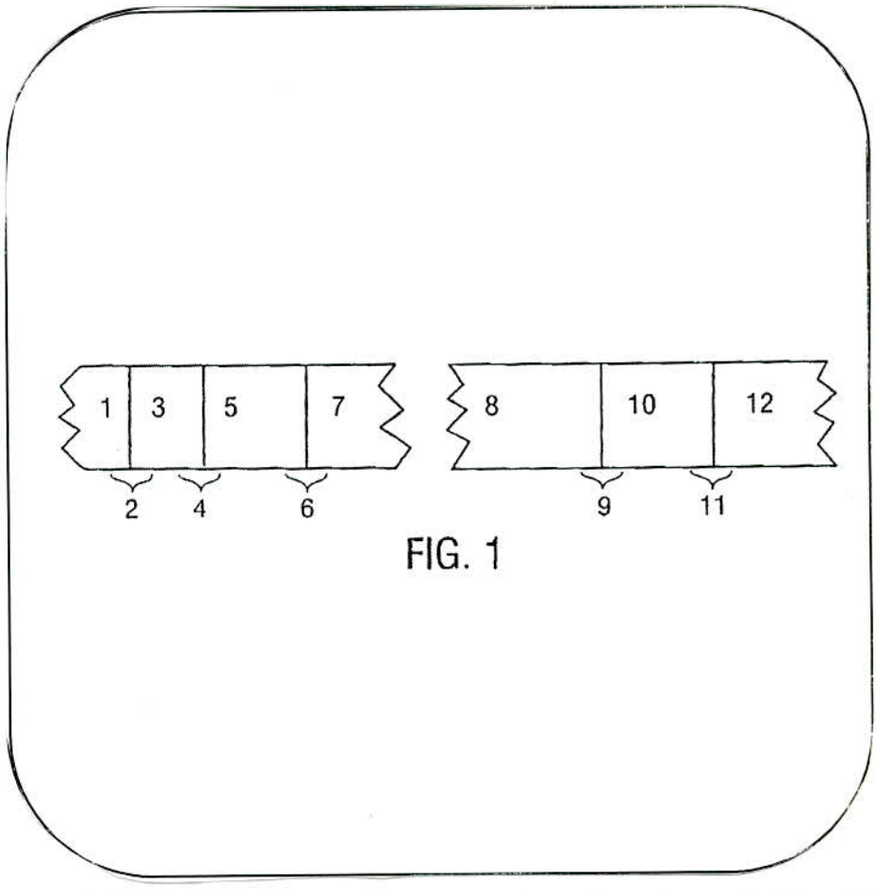


FIG. 1

12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

12740 14
6324

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

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

10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

TRADUCCION No.: 1206/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
11 JUN 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

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

181

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

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

12746

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

MONSANTO TECHNOLOGY LLC

domiciliado (s) en/or 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America,

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

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

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits

DESPACHO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE SE TUVO A LA VISTA
11 JUN 2002
NOTARIO

TRADUCCION No: 150601
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

© CAVELIER ABOGADOS

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

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

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

en/in St. Louis, MO

por/by Dennis R. Hoerner, Jr.

Firma Dennis R Hoerner Jr Signature

TRADUCCION No.: 15.06/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
11 JUN 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

© CAVELIER ABOGADOS

L1899.0222.00C000 (MOBT:222-CO)
38-21(51932)A CO

5

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

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

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

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

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

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

_____Notario Público o Funcionario Autorizado --Notary Public or Attesting Oficial_____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 18 de Mayo de 200 1
Compareció(eron) ante mi Dennis R. Hoerner Jr.
[illegible]n(es) conozco personalmente y que firma(n) este [illegible]umento en representación de la Sociedad/compañía denominada MONSANTO TECHNOLOGY LLC

[illegible]rtifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

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

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

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

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

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

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

Ciudad St. Louis

Estado Missouri EUA

Hoy 18 de Mayo de 200 1

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

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

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

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

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That MONSANTO TECHNOLOGY LLC

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

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

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO CERTIFICO QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
11 JUN 2002
NOTARIO

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

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

City St. Louis

State Missouri US

This 18th day of May 200 1

_____Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Oficial

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

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

TRADUCCION No.: 15/06/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

© CAVELIER ABOGADOS

Monsanto Technology LLC
COLO 12746-801-001-3

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

11 JUN 2002

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

© CAVELIER ABOGADOS

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

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

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

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA COPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
11 JUN 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. Ha sido firmado por JUDITH A. LORENZ

3. Actuando en su capacidad de NOTARIO PÚBLICO

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

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri.

6. el 29 de mayo de 2001

7. Por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri.

8. No. 63157.

9. Sello: Sello del Secretario de Estado, Missouri.

10. Firma: (Firma) Matt Blunt.

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

WPC 12746-801-001-3

ID 3

JUN 12/01

TRADUCCION No.: 150601
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COTEJO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
11 JUN 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2001 JUN 12 A 11:40
JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

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

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 12 JUN. 2001

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

11 JUN 2002

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

This application claims priority to U.S. Provisional Application 60/297,406, filed June 11, 2001.

FIELD OF THE INVENTION

This invention is in the field of plant molecular biology, and in particular to plant insect protection and plant breeding, and is directed to a novel transformation event of cotton plants, *Gossypium hirsutum*, comprising a polynucleotide sequence inserted into a specific site within the genome of a cotton cell, said sequence encoding a Cry2Ab lepidopteran insect inhibitory protein. Additionally, the invention is related to cotton plants derived from that transformation event and to assays for detecting the presence of the event in a sample.

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to a previously commercialized Lepidopteran resistant cotton plant event, known as MON531, expressing a chimeric form of a Cry1A insect inhibitory protein. Cotton plants are susceptible to insect infestation in all areas of the world in which the plants are cultivated. Recombinant DNA technology has been applied to cells of the cotton plant for about a decade, and cotton plants which exhibit improved characteristics as a result of the insertion of heterologous DNA sequences have been produced using recombinant DNA technology since about the early 1990's. Some of the improvements exhibited by recombinant cotton plants includes herbicide tolerance, improved fiber characteristics, and resistance to insect infestation.

The first recombinant cotton plants protected from *Lepidopteran* insect infestation were produced, approved by regulatory agencies for commercial distribution, and subsequently commercialized in 1996. These cotton plants contained a DNA sequence encoding a chimeric Cry1A lepidopteran insect inhibitory protein, primarily from the MON531 event. This particular trait, along with an adjacent linked DNA sequence encoding a selectable marker, has been transferred by conventional breeding into a number of cotton varieties, each of which are particularly suited for enhanced production of cotton in diversified geographic locations throughout the world. These recombinant varieties have enjoyed a tremendous commercial success for a number of

reasons. One reason is that yields per acre of cotton production have on average improved dramatically because of reduced insect infestation as a result of the presence of the insect inhibitory protein present within each cell of the cotton plant. Another principle reason for the commercial success has been the reduced labor and expense due to the reduction in applications of chemical pesticides required to protect the crop from insect infestation. In addition, the reduction in chemical pesticide applications improves the overall health of the environment by avoiding the annihilation of insects or arachnids and other species which present no material threat to the crop in the field, reduces the load of chemical pesticide toxins applied to the environment, and allows the farmer to avoid the risks associated with the potentially harmful effects of exposure to chemical pesticides.

It soon became apparent that a product with a broader range of efficacy against insects would be desirable. While it may be seen as simple in view of the chemical arts to provide a combination of insect inhibitory proteins for this purpose and possibly to delay or prevent toxin resistance from being developed in the target insect population, in reality the development of a plant meeting these characteristics is problematic, and requires a great deal of resources, technical ability, and trial and error experimentation in order to obtain a single recombinant plant transformation event which results in a morphologically normal plant exhibiting the desired combination of insect inhibitory proteins produced in sufficient levels and at appropriate times during the plant growing season and in the tissues upon which target pest species feed.

Thus, there existed a need for the development and characterization of cotton plants exhibiting the characteristics of enhanced insect resistance as a result of the presence of two or more insect inhibitory proteins produced from DNA sequences incorporated into the genome of the plant cells. Furthermore, it would be desirable for the insect inhibitory traits (i) to segregate ndependently of one another, (ii) to not cause any adverse effects upon the physiology and metabolism of the plant, and (ii) to have little if any adverse effect upon the yield or quality of the fiber produced from said plant.

It is advantageous to be able to detect the presence of a particular event in order to determine whether progeny of a sexual cross contain a transgene of interest. In addition, a method for detecting a particular event may be helpful for complying with regulations requiring the pre-market approval of the sale of seeds to produce transgenic crop plants and foods derived from such plants, for example, or for use in environmental monitoring, monitoring traits in crops in the field, or

monitoring products derived from a crop harvest, as well as for use in ensuring compliance of parties subject to regulatory or contractual terms.

It is possible to detect the presence of a transgene by any nucleic acid detection method known in the art including but not limited to thermal amplification (PCR™) or DNA hybridization using nucleic acid probes. Typically, for the sake of simplicity and uniformity of reagents and methodologies for use in detecting a particular DNA construct that has been used for transforming various plant varieties, these detection methods generally focus on frequently used genetic elements, such as promoters, terminators, marker genes, etc., because for many DNA constructs, the coding sequence region is interchangeable. As a result, such methods may not be useful for discriminating between separate events produced from the same DNA construct or very similar constructs. These methods can be used, however, if the sequence of chromosomal DNA adjacent to the inserted DNA ("flanking DNA") is known. An event-specific thermal amplification (PCR™) assay is discussed, for example, by Windels et al. (*Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent* 64/5b:459-462, 1999), who identified glyphosate tolerant soybean event 40-3-2 using a thermal amplification primer set spanning the junction between the insert and flanking DNA. Specifically, one primer included sequence from within the insert and a second primer included sequence from flanking DNA. Such a method was also developed for event MON531 and is the subject of a separate patent application. It would be desirable to have such a method that would detect the presence of the new event of the present invention, even in the presence of event MON531. These and other advantageous advances have been achieved by the present invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

The cotton event MON531, described above, was transformed a second time with a genetic construct named PV-GHBK11 comprising the coding sequence for Cry2Ab, an insect-inhibitory protein, and one event of this transformation effort has been selected for potential commercial introduction. It is denominated as MON15985. Because it is a new insertion event, it will segregate from the inserted *cry1Ac* gene of MON531 in breeding. A line of cotton containing only the MON15985 insertion is denominated as MON15985X. According to one aspect of the invention, compositions of matter for these cotton lines are provided. The cotton seeds comprising cotton event MON15985 were deposited on September 29, 2000, with the American Type Culture Collection and are designated as ATCC accession number PTA-2516.

In another aspect of the invention, methods for detecting the presence of the MON15985 event are provided. DNA sequences are provided that identify the inserted DNA sequences and the native cotton flanking sequences of MON15985. From these DNA sequences primers can be designed for use in a PCR diagnostic assay. Exemplary primers are provided as are the amplicons produced by the use of such primers when amplified in the presence of MON15985 DNA.

It should be noted that the detection of a sequence diagnostic for the insertion of cotton event MON15985 may be insufficient to answer all questions about a particular seed sample. The seed line denominated MON15985 contains both that insertion and the previous one identified as MON531. Thus, in another aspect of the invention, a method for distinguishing between MON15985 and MON15985X, a line lacking the MON531 event, is provided. The method uses one or more of the previously known sequences diagnostic for MON531.

A junction sequence herein spans the point at which DNA inserted into the genome is linked to DNA from the cotton native genome flanking the insertion point, the identification or detection of one or the other junction sequences in a plant's genetic material being sufficient to be diagnostic for the event. Included are the DNA sequences that span the insertions in cotton event MON15985 and similar lengths of flanking DNA. Examples of such diagnostic sequences are the 20-mer junction sequences of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18; however, other sequences of as little as 15 base pairs which overlap the junctions of the insertions or the junctions of the insertions and the genomic sequence are also diagnostic and could be used. Nucleic acid amplification of genomic DNA from the event, using the primers provided herein or designed by one of ordinary skill in the art, produces an amplicon comprising such diagnostic DNA sequences. In addition, detection of the binding of oligonucleotides which bind specifically to the diagnostic sequences described herein is also diagnostic for the event.

According to another aspect of the invention, oligonucleotide sequence primer pairs for distinguishing cotton event MON15985 from the native, nontransformed, and undisturbed sequence are provided. In particular, such flanking sequence primers pairs comprise two isolated nucleic acid molecules selected from SEQ ID NO:11 or alternatively SEQ ID NO:12, the amplicon of which will overlap one or more junction sequences in the inserted DNA, depicted as reference numbers 2, 4, 6, 9, and 11 in Figure 1. For example, one may select an isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from about base pair positions 1-361 as set forth in SEQ ID NO:11 which are from the cotton genomic DNA sequence flanking the 5' end of the inserted DNA, depicted as

reference 1 in Figure 1, and at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from about base pair positions 674-1361 as set forth in SEQ ID NO:11 which are within inserted DNA, which is depicted as reference number 3 and part of 5 in Figure 1. Additional primer pairs useful in analyzing for cotton event MON15985 comprising at least one isolated nucleic acid of at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 1-1885 of SEQ ID NO:11 paired with at least one isolated nucleic acid of at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 362-2267of SEQ ID NO:11 can be readily devised by one of ordinary skill in the art. Similarly, primer pairs can be derived from nucleotides 1-673 of SEQ ID NO:12 and nucleotides from nucleotides 350-1361 of SEQ ID NO:12, each primer being at least fifteen nucleotides long.

According to another aspect of the invention, specific primer sets that are useful for nucleic acid amplification, for example, are provided. Specifically, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27 are a such a primer set and can be used to produce an amplicon which is diagnostic for the presence of cotton event MON15985 DNA. SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29 are another such primer set. In contrast, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:29 are capable of producing an amplicon from DNA samples obtained from other than cotton event MON15985, and from hemizygous genomes comprising the wild type sequence at the point at which the MON15985 sequence integrated into the genome as well as the MON15985 integrant sequence, and said amplicon would appear to be diagnostic for the absence of inserted DNA from cotton event MON15985 in a sample, and produce no amplicon in a sample containing DNA of that event. Caution should be exercised in interpreting such a result, however, and one skilled in the art would recognize that when present as a hemizygous member of a chromosome pair, the use of SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:29 as a diagnostic tool for proving a negative or a positive may be erroneous.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the cotton event MON15985 in a sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the sample comprising DNA with a primer set that, when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON15985, produces an amplicon that is diagnostic for cotton event MON15985; (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the cotton event MON15985 in a sample, such methods comprising: (a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions

X3

13

with genomic DNA from cotton event MON15985 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with DNA from a control cotton plant; (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

Another aspect of the present invention are methods and compositions for detecting the presence of a target site, i.e., at least one of the junctions, identification or detection of which would be diagnostic for the presence of the integrated DNA with the genomic of the cotton plant in the cotton event MON15985, in a sample of nucleic acid derived from or obtained from the genome of the cotton event MON15985, using a variety of detection methods including TAQMAN (Perkin Elmer) or related flourophore/quencher methodologies, thermal amplification, ligase chain reaction, southern hybridization, ELISA methods, and colorimetric and fluorescent detection methods. In particular, the present invention provides for kits for detecting the presence of the target sequence, i.e., at least one of the junction sequences in the cotton event MON15985, in a sample containing genomic nucleic acid from the cotton event MON15985. The kit is comprised of at least one polynucleotide capable of binding to the target site or substantially adjacent to the target site and at least one means for detecting the binding of the polynucleotide to the target site. The detecting means can be selected from the group consisting of fluorescent, chemiluminescent, colorimetric, or isotopic and can be coupled at least with immunological methods for detecting the binding. A kit is also envisioned which can detect the presence of a target site in a sample, i.e., at least one of the junctions of the insert DNA with the genomic DNA of the cotton plant in the MON15985 event, taking advantage of two or more polynucleotide sequences which together are capable of binding to nucleotide sequences adjacent to or within about 100 base pairs, or within about 200 base pairs, or within about 500 base pairs or within about 1000 base pairs of the target sequence and which can be extended toward each other to form an amplicon which contains at least the target site.

The foregoing and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description and accompanying drawing.

DRAWING

Figure 1 is a graphical representation of the sequence alignment for the DNA which is flanking the inserted sequences and the inserted sequences themselves, including the *cry2Ab* gene in cotton event MON15985. The inserted DNA is depicted as a single strand with 5' from the left through 3' to the right. Individual DNA sequences identified herein are labeled as follows: reference number 1 is the 5' end flanking genome sequence (SEQ ID NO:19); reference number 2 is

the junction sequence overlapping the sequences overlapping reference numbers 1 and 3, a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:14; reference number 3 is a chloroplast related sequence of extraneous DNA (SEQ ID NO:20); reference number 4 is the junction sequence overlapping the sequences of reference numbers 3 and 5, a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:15; reference number 5 is a remnant of cotton genome sequence (SEQ ID NO:21); reference number 6 is the junction sequence overlapping the sequences of reference numbers 5 and 7, a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:16; reference number 7 is a portion of the 5' end of the intentionally inserted sequence (SEQ ID NO:22); reference number 8 is a portion of the 3'end of the intentionally inserted sequence (SEQ ID NO:23); reference number 9 is the junction sequence overlapping the sequences of reference numbers 8 and 10, a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:17; reference number 10 is another unintentionally inserted remnant of cotton genome sequence (SEQ ID NO:24); reference number 11 is the junction sequence overlapping the sequences of reference numbers 10 and 12, a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:18; and reference number 12 is the 3' flanking cotton genome sequence, as set forth in SEQ ID NO:25.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Cotton, *Gossypium hirsutum*, has been genetically modified to resist *Lepidopteran* pests, which have a negative impact on cotton production. This was accomplished by the insertion of a first DNA cassette that encodes the insecticidal Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* and a second DNA cassette that encodes the insecticidal Cry2Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. This invention relates preferably to plants, plant parts, progeny plants which contain at least the sequences comprising the second DNA cassette, and to methods and compositions of matter for use in detecting the presence of said sequences in a sample.

The first DNA cassette was inserted into the genome of cotton cultivar Coker 312 through *Agrobacterium sp* transformation using a DNA fragment derived from plasmid PV-GHBK04 (pMON10518 in U.S. Patent No. 5,500,365) to produce cotton event MON531, which has been bred with many different cotton varieties and successfully introduced in cotton markets around the world. Cotton event MON531 was retransformed using particle acceleration technology with a gel purified linear DNA fragment, i.e., the second cassette indicated herein and above, from plasmid PV-GHBK11 (alternatively termed pB1579), which contained *cry2Ab* and β-glucuronidase (*uidA*) coding regions.

(John, M.E. 1997. *Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering*. Critical Reviews in Biotechnology, 17 (3): 185-208). The *uidA* gene was used as a selectable marker to aid in identifying cells which contained the cry2Ab coding region. The *cry2Ab* coding region derived from plasmid PV-GHBK11 comprises the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter with a duplicated enhancer region (U.S. Patents 5,530,196; 5,424,200; and 5,359,142) operably connected to a petunia heat shock protein untranslated leader sequence (PetHSP70-leader) operably connected or linked to the N-terminal chloroplast transit peptide from *Arabidopsis thaliana* EPSPS gene (AEPSPS/CTP2) (Van den Broeck, et. al. 1985. *Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*. Nature 313, 358-63.) operably connected or linked to a synthetic sequence encoding Cry2Ab protein (Widner, W.R. and Whiteley, H.R. 1990. *Location of the Dipteran Specificity Region in a Lepidopteran-Dipteran Crystal Protein from Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol. 172, 2826-32.) which is operably connected or linked to the 3' nontranslated region of the nopaline synthase (NOS) gene from *Agrobacterium tumifaciens* which terminates transcription and directs polyadenylation (Fraley, R.T., et al. 1983. *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 80 (15), 4803-07.). The β-glucuronidase coding region is also controlled by an enhanced CaMV 35S promoter and a NOS 3' polyadenylation sequence. The insertion of the cassette, or substantially all of the cassette, containing the *cry2Ab* and *uidA* coding sequences into the cotton event MON531 gave rise to an event designated as MON15985 which comprises both the *cry1A* coding sequence as well as the cassette encoding the *cry2Ab* coding sequence. Genetic analysis of the MON15985 event has demonstrated that the two inserted cassettes are on different chromosomes and thus can be segregated in breeding, the segregants giving rise to the original MON531 event genotype as well as a second genotype designated as MON15985X comprising only a single inserted cassette comprising the gene responsible for encoding the Cry2Ab protein. It is the transformation event giving rise to the cotton genotype MON15985 as well as the MON15985X genotype which are intended as the subject matter of this invention.

The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of common terms in molecular biology may also be found in Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and

Lewin. *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994. The nomenclature for DNA bases as set forth at 37 CFR § 1.822 is used.

Comprising

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

Event

As used herein a transgenic "event" refers to a recombinant plant produced by transformation of plant cells with heterologous DNA, i.e., a nucleic acid construct that includes a transgene of interest, regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant, and selection of a particular plant characterized by insertion into a particular genome location. The term "event" refers to the original transformant and progeny of the transformant that include the heterologous DNA. The term "event" also refers to progeny produced by a sexual outcross between the transformant and another variety that include the heterologous DNA. Even after repeated backcrossing to a recurrent parent, the inserted DNA and flanking DNA from the transformed parent is present in the progeny of the cross at the same chromosomal location. The term "event" also refers to DNA from the original transformant comprising the inserted DNA and flanking sequence immediately adjacent to the inserted DNA that would be expected to be transferred to a progeny that receives inserted DNA including the transgene of interest as the result of a sexual cross of one parental line that includes the inserted DNA (e.g., the original transformant and progeny resulting from selfing) and a parental line that does not contain the inserted DNA.

Probes and Primers

A "probe" is an isolated nucleic acid to which is attached a conventional detectable label or reporter molecule, *e.g.*, a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. Such a probe is complementary to a strand of a target nucleic acid, in the case of the present invention, to a strand of genomic DNA from cotton event MON15985 (whether from a cotton plant or from a sample that includes DNA from the event). Probes according to the present invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and can be used to detect the presence of that target DNA sequence.

"Primers" are isolated nucleic acids that are annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, then extended along the target DNA strand by a polymerase, *e.g.*, a DNA polymerase. Primer pairs or

sets can be used for amplification of a nucleic acid sequence, *e.g.*, by the polymerase chain reaction (PCR™), also known as thermal amplification methods, or other conventional nucleic-acid amplification methods.

Probes and primers may be as small as ten nucleotides, but are generally 15 nucleotides or more in length, preferably 20 nucleotides or more, more preferably 25 nucleotides, and most preferably 30 nucleotides or more. Such probes and primers hybridize specifically to a target sequence under high stringency hybridization conditions. Preferably, probes and primers according to the present invention have complete sequence complementarity with the target sequence, although probes differing from the target sequence and which retain the ability to hybridize to target sequences may be designed by conventional methods. Any reference to a specific sequence for a probe or primer or other DNA sequence includes its complementary sequence.

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

Primers and probes based on the flanking DNA and insert sequences disclosed herein can be used to confirm (and, if necessary, to correct) the disclosed sequences by conventional methods, *e.g.*, by re-cloning and sequencing such sequences.

Nucleic-Acid Hybridization; Stringent Conditions; Specific

The nucleic-acid probes and primers of the present invention hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of DNA from a transgenic event in a sample.

The term "stringent conditions" is functionally defined with regard to the hybridization of a nucleic-acid probe to a target nucleic acid (i.e., to a particular nucleic-acid sequence of interest) by the specific hybridization procedure discussed in Sambrook *et al.*, 1989, at 9.52-9.55. *See also*,

Sambrook *et al.*, 1989 at 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, *Nucl. Acids Res.* 12:203-213, 1984; and Wetmur and Davidson, *J. Mol. Biol.* 31:349-370, 1968.

Regarding the amplification of a target nucleic- acid sequence (*e.g.*, by PCR™) using a particular amplification primer pair, "stringent conditions" are conditions that permit the primer pair to hybridize only to the target nucleic-acid sequence to which a primer having the corresponding wild-type sequence (or its complement) would bind and preferably to produce a unique amplification product.

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

Nucleic-Acid Amplification

As used herein, "amplified DNA" or "amplicon" refers to the product of nucleic-acid amplification of a target nucleic-acid sequence that is part of a nucleic acid template. For example, to determine whether the cotton plant resulting from a sexual cross contains an transgenic event genomic DNA from a cotton plant may be subjected to nucleic acid amplification using a primer pair that includes a primer derived from flanking sequence in the genome of the plant adjacent to the insertion site of inserted heterologous DNA and a second primer derived from the inserted heterologous DNA to produce an amplicon that is diagnostic for the presence of the event (e.g., the amplicon is of a length and has a sequence that is diagnostic for the event). Alternatively, a primer pair can be derived from flanking sequence on both sides of the inserted DNA so as to produce an amplicon that includes the entire insert.

Nucleic-acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic-acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR™). A variety of amplification methods are known in the art and are described, *inter alia*, in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202 and in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. Any well known method for nucleic acid amplification may be used in the practice of the present invention.

The sequence of the heterologous DNA insert or flanking sequence from cotton event MON15985 can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such sequences from the event using primers derived from the sequences provided herein followed by standard DNA sequencing.

Detection Kit

As used herein, "detection kit" refers to a kit used to detect the presence or absence of DNA from a MON15985 event in a sample comprising nucleic-acid probes and primers of the present invention, which hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence, and other materials necessary to enable nucleic acid hybridization or amplification methods. Alternatively, a detection kit may comprise materials necessary to enable one skilled in the art to perform methods similar to those described in PCT International Application WO 97/22719, incorporated herein by reference, to detect the presence or absence of DNA from a MON15985 event in a sample.

Example 1

Cotton, *Gossypium hirsutum*, has been genetically modified to resist *Lepidopteran* pests, which have a negative impact on cotton production. This was accomplished as indicated herein by the insertion of a DNA cassette which encodes the insecticidal Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* into the genome of cotton cultivar Coker 312 through *Agrobacterium sp* transformation using a DNA fragment derived from plasmid PV-GHBK04 (pMON10518 in U.S. Patent No. 5,500,365). This transformation resulted in three separate insertions into the cotton genome. The primary, functional insert responsible for expressing the Cry1Ac protein in cotton event 531 comprises the enhanced 35S promoter described above, *cry1Ac* coding region, and termination sequence linked to a sequence which encodes an antibiotic selectable marker. A second insert adjacent to and immediately upstream of the first inserted sequence comprises a partial *cry1Ac* coding region and termination sequence. The third insert comprises only a partial termination sequence and has been shown to segregate independently from the first two sequences indicated above. The first and second inserted sequences are tightly linked and therefore do not segregate from each other. Cotton genome sequence flanks the 5' and 3' ends of all three inserts. Therefore, six unique cotton genome/insert junctions were created as a result of the transformation process. Any of the six junctions could be analyzed for in determining if the MON531 event is present in a cotton seed sample.

Molecular analyses were performed on cotton event MON531 to define the end of one of the transgene DNA insertions and identify the cotton genomic DNA flanking the transgene DNA inserts. Genome walking studies combined with nucleotide sequencing yielded the DNA sequences of two said cotton genome/insert junctions for the primary insert, SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO:2 and their complements. The flanking sequences and insert sequences diagnostic for MON531 were then

identified as follows: SEQ ID NO: 3, the sequence of the 5' end of the primary insert; SEQ ID NO:4, the cotton genome sequence flanking that 5' end; SEQ ID NO:5, the sequence of the insert at the 3' end; and SEQ ID NO:6, the genome sequence flanking that 3' end. As discussed above, primers can be derived from these sequences to use in DNA amplification methods. Examples are SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:8. SEQ ID NO:9 is the sequence of a section of DNA which overlaps cotton genome DNA and one end of the inserted DNA; SEQ ID NO:10 is the sequence of a section of DNA which overlaps cotton genome DNA and the opposite end of the inserted DNA.

The following provides a nonlimiting example of how one might use these novel nucleic acid sequences to detect cotton event MON531 in a sample, including the seed line denominated MON15985, and to check for its absence in the seed line denominated MON15985X.

DNA Isolation for PCR™ Analyses.

DNA from cotton event MON531 was extracted from seed tissue. DNA was extracted from both seed and leaf tissues from the control substance (non-transgenic cotton seed and leaf tissue). DNA from seed was isolated by processing the seed to a fine powder using a commercially available blender. Approximately 2 g of the processed seed was transferred to a 50 ml conical tube, and ~16 ml of CTAB extraction buffer [1.5% (w:w) CTAB, 75 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 1.05 M NaCl, and 0.75% (w:w) PVP (MW 40,000)] was added to the processed seed. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing and then allowed to cool to room temperature. An equal volume (~16 ml) of room temperature chloroform:isoamyl alcohol (24:1 (v/v)) or chloroform was added to the samples. The suspension was mixed by inversion, and the two phases separated by centrifugation at ~16,000 x *g* for 5 minutes. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipet and placed into a clean 50 ml conical tube. Approximately 1/10 volume (~1.6 ml) of 10% CTAB buffer [10% (w:w) CTAB and 0.7 M NaCl] was added to the aqueous phase, which was then mixed by inversion. The samples were centrifuged at ~16,000 x *g* for 5 minutes to separate the phases. The aqueous (upper) phase was removed, mixed with an equal volume (~15 ml) of CTAB precipitation buffer [1% (w:w) CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, and 10 mM EDTA pH 8.0] and allowed to stand at room temperature for approximately 1 hour. The samples were centrifuged at ~10,000 x *g* to pellet the DNA, the supernatant was decanted, and the pellet was dissolved in approximately 2 ml of high salt TE [10mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, and 1 M NaCl] by incubating at 37°C with gentle

swirling for approximately 2 hours. Centrifugation was performed at ~23,000 x *g* to pellet any remaining impurities. The supernatant was removed, placed into a clean 15 ml tube, and approximately 1/10 volume (~150 µl) of 3M NaOAc, pH 5.2, and 2 volumes (~4 ml relative to the supernatant) of chilled 100% ethanol were added to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing approximately 1 ml of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 5 minutes, dried, and re-dissolved in TE, pH 8.0 in a 4°C refrigerator overnight.

The non-transgenic cotton genomic DNA used as a control was isolated from leaf tissue that was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue was transferred to a 13 ml centrifuge tube and 6 ml of extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM sorbitol, 100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.38% (w/v) sodium bisulfite), 2.5 ml nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB), and 1 ml Sarkosyl (5% (w/v) solution)] was added. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing. Four and a half milliliters of chloroform:isoamyl alcohol (24:1 (v/v)) at room temperature was added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated by centrifugation for 15 minutes at ~2,000 x *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipette and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing 500 µl of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 2 minutes. The DNA was dried and dissolved in TE buffer in a 4°C refrigerator overnight.

PCR™ Verification of Unique Insert-Cotton Genome Junctions in Cotton Event MON531.

The DNA sequences of four cotton genome/insert junctions were identified using the PCR™-based Universal GenomeWalker Kit™ as per the manufacturer's protocol followed by nucleotide sequencing of the PCR™ products. Next, PCR™ assays were developed using one primer complementary to cotton genomic DNA and another primer complementary to inserted transgene DNA. For example, one primer designed to the 3' end of the primary, functional insert complementary to genomic flanking sequence (e.g., SEQ ID NO:6) paired with a second primer at the 3' end of the primary, functional insert complementary to inserted transgene sequence (e.g., SEQ

ID NO:5). The PCR™ assays were performed using 10 - 100 ng of cotton event MON531 genomic DNA template in a 50 µl reaction volume containing a final concentration of 1.1 mM Mg^{2+}, 0.4 µM of each primer, 200 µM each dNTP, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase. The reactions for the PCR™ assays were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 38 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 90 seconds; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The PCR™ products were separated using agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining, excised from the gel, and subjected to DNA sequencing using dye-terminator chemistry to confirm the sequences.

In the example above, as expected, the control reactions without template DNA and Coker 312 non-transgenic negative control DNA did not generate a PCR™ product. The cotton event MON531 samples generated the expected size PCR™ products of 264 bp for the 3' flanking sequence. Therefore, the novel nucleic acid sequences at the junction of inserted DNA and cotton genomic DNA in cotton event MON531 are useful for detecting DNA derived from cotton event MON531 in a sample.

MON531 in the variety Coker 312 background was crossed into the variety DP50 (Delta & Pine Land Company) to produce a variety containing the MON531 event encoding the Cry1Ac protein, which was designated as DP50B.

EXAMPLE 2

This example describes the production of a transformed cotton plant designated as MON15985 derived from DP50B which contains an additional insertion event encoding a Cry2Ab insect inhibitory protein, and the isolation and characterization of the 5' and 3' DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the MON15985.

Target DP50B plant cells were transformed using particle acceleration technology with a linear DNA segment derived from plasmid PV-GHBK11. The linear DNA segment was prepared by digestion of plasmid PV-GHBK11 with the restriction enzyme KpnI, separation of the plasmid fragments by agarose gel electrophoresis and isolation of the DNA segment containing cassette comprising the *cry2Ab* coding sequence and *uidA* coding sequence (GUS). No plasmid backbone was contained within the segment or sequence isolated and purified and prepared for bombardment of cotton tissue. The expression cassette consists of a *cry2Ab* coding region regulated by an enhanced CaMV 35S plant expressible promoter and an Agrobacterium tumefaciens NOS3' transcription termination and polyadenylation sequence. The *cry2Ab* coding sequence is designed to

target the expression product as a precursor protein for chloroplast import in plant cells (as disclosed in WO 0026371 and US Patent Application Serial Number 09/186,002, filed November 4, 1998, the entire contents of which are incorporated herein by reference).

The cotton variety DP50B was transformed with the DNA cassette described above by bombardment with DNA coated gold particles using electrostatic discharge method (John, M.E., Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17:185-208 (1997)). Different events were screened for efficacy against insect pests, phenotype, and genetic segregation for expression of the Cry2Ab protein. Based on these criteria, 6 lines were chosen for further characterization of the insertion event. Southern blot was used as the primary method for evaluating the presence of one or more copy numbers of insertion and completeness of the insertion event. One line, 15985, was chosen for a thorough molecular characterization of the insertion event that inserted into the DP50B genome. The DNA surrounding the insertion event was isolated and characterized.

Isolation of the DNA flanking the insertion event: DNA was extracted from young cotton leaves by a modified Phyto- Pure® method from Amersham which is designed to extract DNA from plants with large amounts of contaminating carbohydrates. In order to determine the sequence of the DNA around the inserted *cry2Ab* coding sequence, the Genome Walker® protocol from CloneTech, Inc. was used. The manufacturer's recommended conditions were followed with only one modification: rather than using phenol extraction for purification of the DNA after restriction endonuclease cleavage, the DNA was purified with a Qiagen QIAquick® spin column in accordance with the manufacturer's instruction manual.

The enzymes used to cut the genomic DNA prior to linker ligation were *Dra*I, *Pvu*II. *Sca*I and *Stu*I. Following the procedure provided by Qiagen, the DNA was extracted in 5 volumes of PB buffer, bound to the column, washed with 0.75ml of PE and then eluted from the column into 20mL of 10mM Tris pH 8.5. This DNA was then used as the source for the linker libraries. Primer positions were deliberately chosen away from the ends of where the DNA was linearized to allow for a certain amount of deletion at either end. The first primers (SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:31) were designed to anneal to sequences that are unique to a *cry2Ab* coding sequence because of the presence of repeated DNA elements in the cotton genome. The resulting PCR™ products were subjected to a second PCR™ reaction using nested primers directly adjacent to those used in the first reaction (SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:33). The PCR™ parameters used were those

recommended by CloneTech. The primary amplification parameters were as follows: 7 cycles 94°C 2 sec, 72°C 3min, 32 cycles 94°C 2 sec, 68°C 3 min, and secondary amplification parameters were as follows: 5 cycles 94°C 2 sec, 72°C 3 min, 20 cycles 94°C 2sec, 68°C 3 min, and 68°C 4 min in last cycle. All PCR™ reactions were performed on a Perkin-Elmer 9700 machine.

The resulting PCR™ products from the second amplification were cloned into the pBS(SK+) vector from Stratagene which had been cut with *SmaI* to generate a blunt end and treated with alkaline phosphatase to prevent self-ligation. The DNA fragments that were generated in the secondary PCR™ reaction were treated with T4 DNA kinase to add a 5'phosphate and then ligated into the blunt end vector under standard ligation conditions.

Genome Walker® protocol: The secondary PCR™ reactions using the nested primer pairs produced multiple fragments synthesized from both 5' and 3' ends. Three independent fragments for the 5' end were cloned and sequenced using methods well-known in the art, while two fragments were cloned and sequenced from the 3' end. For each individual fragment, at least two independent clones were obtained.

The sequence of the clones from each primer set were compared to one another. The sequences among the respective clones were determined to be the same, and contained the same plant trans-gene junction.

EXAMPLE 3

This example illustrates how the DNA sequences flanking the MON15985 insertion event can be used to determine zygosity.

Design and development of a PCR™ based test for homozygosity of the MON15985 insertion event: The DNA sequence of the two regions flanking the MON15985 insertion event was used to design a PCR™ based homozygosity test. Such a test would be considered useful if it were able to detect both the specific MON15985 insertion event and the wildtype chromosome. To test the feasibility of developing an assay that also detects the wild type chromosome, primers were designed from the sequence directly adjacent to the insertion event to test if they could be used to synthesize a DNA fragment in the non-transgenic cotton, as well as in the 15895 line. The primers chosen were capable of synthesizing the whole MON15985 insertion event, but no product was observed in the non-transgenic controls. These results indicated that the insertion event was not a simple break in the DNA and insertion of the DNA sequence and cassette encoding the Cry2Ab protein. This result,

however, established that the two ends are indeed connected and flank an intact gene cassette containing *cry2Ab*.

Primers were designed to the nucleic acid sequence flanking the 3' end of the insert to amplify fragments via the Genome Walker® protocol in linker libraries made from non-transgenic cotton DNA. A 620 base pair fragment was cloned and sequenced from non-transgenic cotton. This sequence was then used to design primers for the wild type chromosome that would be present in the heterozygous individual. Several sets of primers were made and tested together in order to find a set that worked in a single reaction and provided no background bands. A primer set comprising SEQ ID NO:34 (3' cotton plant flanking sequence) and SEQ ID NO:35 (5' cotton plant flanking sequence) was found to produce an 800 base pair amplicon from wild type, or non-transgenic cotton DNA. However, if at least one insert is present, the primer comprising SEQ ID NO:36 will anneal to *cry2Ab* specific sequences and generate a 1.5 kb amplicon with a primer annealing to the 3' cotton plant flanking sequence (SEQ ID NO:34). Therefore, the resulting assay using PCR™ primers comprising SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:34, and SEQ ID NO:35 is as follows: if an individual is homozygous for the MON15985 insertion event then only one band of 1.5 kb would be present; but if it is heterozygous then an additional 0.8 kb band would also be present.

Both of these bands (1.5 kb and 0.8 kb) were cloned and sequenced to confirm their identity. The DNA sequence of the 800 base pair fragment generated in heterozygous individuals is identical to the sequence of the Genome Walker® fragment generated with the primers from the 3' end and non-transgenic DNA.

Confirmation of PCR™ based zygosity assay: To verify the precision of the zygosity assay a series of experiments were conducted utilizing known homozygous, heterozygous and negative ransgenic progeny of MON15985.

R2:

Phenotype: Fifteen individual R2 plants from three suspected R1 genotypes were characterized for the presence or absence of the Cry2Ab protein via ELISA. Plants of interest that were positive for the study included MON15985-2 and MON15985-34. Plant MON15985-71 was identified as negative for Cry2Ab protein.

R3:

Phenotype: Fifteen individual R3 seeds from each of the selected R2 plants were planted in

4" pots and subsequently screened for the presence of the Cry2Ab protein via qualitative ELISA. The ELISA results reported that all R3 plants of MON15985-2 were positive, thus giving the R2 parent a designation of being homozygous for the *cry2Ab* gene. R3 progeny of MON15985-34 were a mixture of positive and negative plants giving the R2 parent a designation of being heterozygous for the *cry2Ab* gene. All R3 plants of MON15985-71 were negative and confirmed that the R2 parent was negative as well.

Genotype: A PCR™-based zygosity assay was performed on five R3 plants of MON15985-2 and MON15985-71. Primers and techniques were used as previously described. Results of this test gave the expected banding patterns. All progeny of MON15985-2 produced only the single 1.5 kb band supporting the ELISA data, which indicated the MON15985-2 line is homozygous positive for the *cry2Ab* gene. All progeny of MON15985-71 produced only the single 0.8 kb band found in the wild-type, thus supporting the ELISA results in demonstrating that this line is homozygous negative for the *cry2Ab* gene. Five progeny of each of fourteen individual R2 families of MON15985-34 were screened as well giving combinations of homozygous, heterozygous and negative plants.

R4:

Five individual plants from all three R3 populations were allowed to self pollinate and were taken to harvest. Fifteen R4 progeny from each of the R3 plants tested via PCR™ were planted in 4" pots to confirm the results on the R3 plants. Thus, if the R3 PCR™ result was homozygous then the all the R4 progeny should be homozygous, as well if the R3 PCR™ result was heterozygous the R4 progeny should be a mixture of homozygous, heterozygous and negative plants. All R4 progeny families provided the expected result based on the R3 PCR™ assay. Therefore, the PCR™ based assay provides a durable method for genotyping plants for zygosity.

EXAMPLE 4

This example illustrates the DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert in cotton event MON15985.

DNA from MON15985 was extracted from leaf tissue that was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue

was transferred to a 13 ml centrifuge tube and 6 ml of extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM sorbitol, 100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.38% (w/v) sodium bisulfite), 2.5 ml nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB), and 1 ml Sarkosyl [5% (w/v) solution)] were added. The samples were incubated at 65°C for approximately 35 minutes. Four and a half milliliters of chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] at room temperature were added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated by centrifugation for 15 minutes at ~2,000 × *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing 500 µl of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 2 minutes. The DNA was dried and dissolved in TE buffer in a 4°C refrigerator overnight.

DNA from the DP50 control was extracted from seed tissue. DNA from seed was isolated by processing the seed to a fine powder using a commercially available blender. Approximately 2 g of the processed seed was transferred to a 50 ml conical tube, and ~16 ml of CTAB extraction buffer [1.5% (w/v) CTAB, 75 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 1.05 M NaCl, and 0.75% (w/v) PVP (MW 40,000)] were added to the processed seed. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing and then allowed to cool to room temperature. An equal volume (~15 ml) of room temperature chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] was added to the samples. The suspension was mixed for 5 minutes, and the two phases separated by centrifugation at ~16,000 x *g* for 5 minutes at room temperature. The aqueous (top) layer was removed and placed into a clean 50 ml conical tube. Approximately 1/10 volume (~1.5 ml) of 10% CTAB buffer [10% (w/v) CTAB and 0.7 M NaCl] and an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] were added to the aqueous phase, which was then mixed by inversion for 5 minutes. The samples were centrifuged at ~16,000 x *g* for 5 minutes at room temperature to separate the phases. The aqueous (upper) phase was removed, mixed with an equal volume (~15 ml) of CTAB precipitation buffer [1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, and 10 mM EDTA pH 8.0] and allowed to stand at room temperature for approximately 1 hour. The samples were centrifuged at ~10,000 x *g* to pellet the DNA, the supernatant was decanted, and the pellet was dissolved in approximately 2 ml of high salt TE [10mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, and 1 M NaCl] by incubating at 37°C with gentle swirling for approximately 2 hours or by sitting in a 4°C

refrigerator overnight. Centrifugation was performed at ~23,000 x *g* to pellet any remaining impurities. The supernatant was removed, placed into a clean 15 ml tube, and approximately 1/10 volume (~150 µl) of 3M NaOAc, pH 5.2, and 2 volumes (~4 ml relative to the supernatant) of 100% ethanol were added to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing approximately 1 ml of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 5 minutes, dried, and re-dissolved in TE, pH 8.0 in a 4°C refrigerator overnight.

DNA from each of DP50 and MON15985 was quantitated prior to the initiation of the study within the study from which they were derived. DNA quantitation was conducted using a Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer using Boehringer Mannheim molecular size marker IX as a DNA calibration standard.

PCR analysis of the genomic sequence flanking the 5' end of the insert encoding Cry2Ab protein in cotton event MON15985 was performed using one primer derived from the 5' genomic flanking sequence paired with a second primer located in the inserted DNA near the 5' end in the enhanced CaMV 35S promoter sequence, spanning a 1894 bp region (SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27). The PCR analysis for the genomic sequence flanking the 3' end of the insert encoding Cry2Ab protein in cotton event MON15985 was conducted using one primer located in the NOS 3' polyadenylation sequence near the 3' end of the insert paired with a second primer derived from the 3' genomic flanking sequence, spanning a 763 bp region (SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29).

The PCR analyses were conducted using genomic DNA from the cotton event MON15985 or non-transgenic cotton line DP50. The PCR analysis was conducted using 35-50 ng of cotton event MON15985 or non-transgenic line DP50 genomic DNA template in a 50 µl reaction volume containing a final concentration of 1.5 mM Mg^{2+}, 0.2 µM of each primer, 200 µM each dNTP, and 2.5 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL). The reactions for the 5' end of the insert were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 35 cycles of 94°C for 1 minute, 56°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The reactions for the 3' end of the insert were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 35 cycles of 94°C for 1 minute, 53°C for 1 minute, 72°C for 45 seconds; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The PCR products were separated on a 1.0 % agarose gel. Electrophoresis was conducted for approximately 1.5-2 hours at 100 V and visualized by ethidium bromide staining.

PCR products of the expected sizes containing the sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert encoding Cry2Ab protein in cotton event MON15985 generated with two primer pairs were isolated by gel electrophoresis of 20 µl of the PCR products on 1.0% agarose gels. PCR products representing the 5' or 3' flanking sequences were excised from a gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) following the procedure supplied by the manufacturer. For both analyses, the purified PCR products were then sequenced with the PCR primers using dye-terminator chemistry. Due to the length of the PCR products, sequencing was performed with both the primers used to generate the products as well as primers designed internal to the amplified sequence.

PCR analyses were performed on genomic DNA extracted from cotton event MON15985 and non-transgenic cotton line DP50 to verify the DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert in cotton event MON15985. The control reaction containing no template DNA as well as the reaction containing DP50 non-transgenic cotton DNA did not generate a PCR product, as expected. PCR analysis of the cotton event MON15985 DNA generated the expected size product of 1894 bp representing the 5' flanking sequence and a portion of the 5' end of the insert encoding Cry2Ab protein.

The control reaction containing no template DNA as well as the reaction containing DP50 non-transgenic cotton DNA did not generate a PCR product, as expected. PCR analysis of the cotton event MON15985 DNA generated the expected size product of 763 bp representing the 3' flanking sequence and a portion of the 3' end of the insert. These results demonstrate that a predicted size PCR product is generated from both ends of the insert encoding Cry2Ab in the cotton event MON15985.

The consensus sequence representing the cotton genomic DNA sequence flanking the 5' end of the insert, as well as DNA at the 5' end of the insert, is represented by SEQ ID NO:11. The 5' consensus sequence data contains 1877 bp of DNA flanking the insert followed by 390 bp of insert sequence containing the enhanced CaMV 35S promoter. Base pairs 362-750 show homology to chloroplast DNA. The consensus sequence representing the cotton genomic sequence flanking the 3' end of the insert, as well as the DNA at the 3' end of the insert, is represented in SEQ ID NO:12. The 3' consensus sequence data contains 349 bp of insert sequence containing the 3' end of the NOS 3' polyadenylation sequence and polylinker sequence followed by 1012 bp of cotton genomic DNA flanking the insert. The reported 5' and 3' consensus sequences presented here are the combination

of multiple sequencing reactions and are shorter than those of the PCR products used to generate the sequences. These data delineate the 5' and 3' ends of the insert in the cotton event MON15985 and show the DNA which immediately flanks the insert on both ends.

This data demonstrates that cotton event MON15985 contains a single DNA insert containing (1) a sequence encoding UidA (GUS) regulated by the enhanced 35S CaMV promoter (lacking approximately 260 bp at the 5'end) and NOS 3' polyadenylation sequence; and (2) a coding sequence encoding Cry2Ab regulated by the enhanced 35S CaMV promoter and the NOS 3' polyadenylation sequence (Figure 1). PCR and sequence analyses performed in this example confirm the sequence of the 5' and 3' ends of the insert encoding Cry2Ab in the cotton event MON15985, and verify the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the insert.

EXAMPLE 5

This example illustrates the physical characteristics of the sequences flanking the cotton event MON15985, and characterizes the nature and physical location of additional DNA sequences flanking the 5' and 3' end of the inserted DNA in the cotton event MON15985. Genomic DNA was analyzed by Southern blotting to determine the number of insertion events, the copy number of the inserted DNA, the integrity of the inserted promoters, coding regions, and polyadenylation sequences, and the presence or absence of plasmid backbone sequence. All analyses were performed with both the cotton line DP50B (control) and with the newly produced MON15985 event to characterize the newly inserted DNA. In addition, the flanking sequence of the 5' and 3' "insert-to-plant" junctions (previously determined by Genome Walking) were confirmed by PCR.

Plasmid PV-GHBK11, the source plasmid, served as the primary reference substance in these analyses. The plasmid, mixed with DNA from the DP50 control substance, was used as a size indicator and a positive hybridization control in Southern blot analysis. Additionally, molecular size markers from Boehringer Mannheim [Molecular Weight Markers II (23.1 Kb-0.6 Kb) and IX (1.4 Kb-0.072 Kb), catalog #236 250 and #1449 460, respectively] and Gibco BRL [High Molecular Weight DNA Marker (48.5 Kb-8.3 Kb) and 100 bp ladder (2.1 Kb-0.1Kb), catalog #15618-010 and #15628-019, respectively] were used for size estimations.

Genomic DNA from insect protected cotton event MON15985 was digested with a variety of restriction enzymes and subjected to Southern blot hybridization analysis to characterize the DNA encoding Cry2Ab and GUS integrated into the genome of DP50B.

DNA extracted from leaf tissue was used for all of the analyses in this example except for the nontransgenic sample on the *uidA* gene cassette intactness blot probed with the NOS 3' polyadenylation sequence probe which was isolated according to the method of Rogers and Bendich (1985). Leaf tissue was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue was transferred to 13 ml centrifuge tube containing 6 ml of the extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM Sorbitol, 100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA), 2.5 ml Nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB), and 1 ml Sarkosyl (5% solution)]. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing. Four and a half milliliters of a mixture of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) at room temperature was added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated by centrifugation for 15 minutes at ~1,000 x *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipette and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was pelleted by centrifuging at ~1,000 x *g* for 5 minutes at 4°C. The pellet was washed with approximately 1 ml of 70% ethanol and centrifuged for an additional 5 minutes at ~1,000 x *g* at 4°C . The DNA was allowed to dry at room temperature and re-dissolved in TE at 4°C overnight.

The purified genomic DNA was quantitated using a Hoefer DyNA Quant™ 200 Fluorometer (San Francisco, CA) with Boehringer Mannheim Molecular Weight Marker IX used as a calibration standard.

Approximately 10 µg of genomic DNA from the test and control lines were used for the restriction enzyme digests. Overnight digests were performed at 37°C according to manufacturers protocols in a total volume of 500 µl using 100 units of restriction enzyme. Some of the control digests were spiked with either 5 or 10 pg of PV-GHBK11. All restriction enzymes were purchased from Boehringer Mannheim. After digestion, the samples were precipitated by adding 1/10 volume (~50 µl) of 3M NaOAc and 2 volumes (~1 ml relative to the original digest volume) of 100% ethanol, followed by incubation at -20°C for at least one hour. The digested DNA was pelleted by centrifugation, washed with 70% ethanol, vacuum dried for 10-20 minutes, and re-dissolved at room temperature in either water or TE.

Digested DNA's were separated on 0.8% agarose gels in 1X TBE buffer. A 'long run' and a 'short run' were performed for each Southern blot analysis. The long run facilitated greater

resolution of the higher molecular weight DNA's while the short run ensured that all smaller molecular weight DNA's were retained on the gel. The long run/short run involved a 4-6 hour electrophoresis at 80-85 V and an overnight (9-15 hour) run at 35-38 V. After electrophoresis, the gels were stained in 0.5 µg/ml ethidium bromide for 20-30 minutes and photographed.

Plasmid PV-GHBK11 DNA was isolated from overnight *E. coli* cultures. Probe templates homologous to the *cry2Ab* coding region, *uidA* coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, the NOS 3' polyadenylation sequence, and the entire backbone region were prepared by PCR using PV-GHBK11 as the template.

Approximately 25 ng of each probe template, except the NOS 3' polyadenylation sequence, were labeled with ^{32}P-dCTP using the random priming method (RadPrime DNA Labeling System, Life Technologies). The NOS 3' polyadenylation sequence was labeled using PCR with NOS 3' template (15 ng), NOS 3' specific primers (0.25 µM each), 1.5 mM $MgCl_2$, 3 µM dATP, dGTP, and dTTP, 100 µCi of ^{32}P-dCTP and 2.5 Units of *Taq* DNA polymerase in a final volume of 20 µl. The cycling conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 5 cycles at 94°C for 45 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The radiolabeled probe was purified using a Sephadex G-50 column (Boehringer Mannheim).

Southern blot analyses (Southern, 1975) were performed established procedures, generally Maniatis Fritsch Sambrook (Cold Spring Harbor). Following electrophoresis, the gel was incubated in depurination solution (0.125 N HCl) for ~ 10 minutes followed by denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) for ~30 minutes, and then neutralizing solution (0.5 M Tris-HCl pH 7, 1.5 M NaCl) for ~30 minutes. The DNA from the agarose gels was transferred to Hybond-N™ nylon membranes (Amersham) using a Turboblotter™ (Schleicher & Schuell). The DNA was allowed to transfer for 4 hours to overnight (in 20X SSC) and covalently cross-linked to the membrane with a UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) set to autocrosslink. The blots were prehybridized an average of 2 hours in an aqueous solution of 0.5 M sodium phosphate, 7% SDS (w/v), and 0.1 mg/ml *E. coli* tRNA. Hybridization with the radiolabeled probe was performed in fresh prehybridization solution for 14-21 hours at approximately 65°C. Membranes were washed at least four times in an aqueous solution of 0.1% (w/v) SDS and 0.1X SSC for 15 minute intervals at 65°C. Multiple exposures of the blots were generated using Kodak Biomax MS™ film in conjunction with one Kodak Biomax MS™ intensifying screen. Blots were stripped by incubating the blot with boiling 0.1% (w/v) SDS and allowing it to cool to room temperature.

The insert number (the number of integration sites of newly introduced transgenic DNA in the cotton genome) was evaluated. The test and control DNA's were digested with the restriction enzyme *Sca*I, which does not cleave within the DNA segment used for transformation. This enzyme released a segment containing the inserted DNA and adjacent plant genomic DNA. The plasmid-spiked DP50 'short run' samples were also digested with *Xba*I to linearize the plasmid. The blot was probed with the reference plasmid PV-GHBK11.

The number of copies of the transformation cassette inserted into each locus was determined by digesting the test genomic DNA with the restriction enzyme *Sph*I, an enzyme that cuts only once in the linear DNA segment used to generate the event. The blot was probed with the reference plasmid PV-GHBK11.

The integrity of the *cry2Ab* coding region was determined by digestion with a restriction enzyme, *Nco*I, that cleaves at the 5' and 3' ends of the *cry2Ab* coding region. The blot was probed with the full length *cry2Ab* coding region.

The integrity of the *cry2Ab* encoding cassette (enhanced CaMV 35S promoter, *cry2Ab* coding region, and NOS 3' polyadenylation sequence) was assessed by digestion with the restriction enzyme *Bam*HI which cleaves at the 5' and 3' ends of the *cry2Ab* cassette. The blot was sequentially probed with each element of the cassette.

The integrity of the *uidA* coding region was determined by digestion with the restriction enzymes *Eco*RI and *Bgl*II which cleave at the 5' and 3' ends of the *uidA* coding region, respectively. The blot was probed with the full length *uidA* coding region.

The integrity of the *uidA* cassette (enhanced CaMV 35S promoter, *uidA* coding region, and NOS 3' polyadenylation sequence) was assessed by digestion with the restriction enzymes *Bam*HI and *Sph*I which cleave at the 5' and 3' ends of the UidA cassette. The blot was sequentially probed with each element of the cassette.

The backbone region of the plasmid is defined as the *Kpn*I restriction fragment of PV-GHBK11 that was not used to transform the plant. It consists of a bacterial origin of replication, ori-pUC, and the *nptII* gene under the control of a bacterial promoter. To confirm the absence of backbone, genomic DNA was digested with the restriction enzyme *Kpn*I and probed with the full-length backbone region.

The sequence of the 5' and 3' insert-to-plant genomic DNA junctions were determined as described above using Clontech's Universal Genome Walker™ Kit. Primers were designed to verify

these junctions by PCR. The 5' junction was verified using one primer designed to the 5' genomic flanking sequence paired with a second primer in the enhanced CaMV 35S promoter of the *uidA* gene. The 3' junction was verified using a primer designed to the 3' genomic flanking sequence with a second primer located in the *cry2Ab* gene. The PCRs were conducted using 100 ng of leaf genomic DNA (1-2 µl) as a template, 10 pmol of each primer (1 µl each), and PCR Supermix (Gibco BRL cat no. 10572-014) in a 25 µl reaction volume. The amplification of the reactions was performed under the following cycling conditions: 1 cycle 94°C for 3 minutes; 30 cycles 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; 1 cycle 72°C for 4 minutes. The PCR products were separated on a 1% agarose gel in 1X TAE and visualized by staining with ethidium bromide.

Test and control DNA samples were digested with *Sca*I. DP50 control DNA spiked with PV-GHBK11 was also digested with *Sca*I. Since *Sca*I does not cleave within the plasmid, a second enzyme, *Xba*I, was added to linearize the plasmid. The plasmid was linearized to facilitate its migration through the gel to serve as an accurate size estimator. The blot was probed with radiolabeled PV-GHBK11 (Figure 1), the source plasmid for the linear DNA segment used in the transformation. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size band at approximately 8.7 Kb, the size of the whole plasmid, with no additional bands. The DP50B long and short runs produced two bands at approximately 22 Kb and 15 Kb (very faint). Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B (MON531) control they are considered background bands associated with the MON531 event. The MON15985 long and short each produced one band not present in either the DP50 or the DP50B lanes at approximately 9.3 Kb. This result suggests that cotton event MON15985 contains one segment of integrated DNA located on a 9.3 Kb *Sca*I restriction fragment.

Genomic DNA isolated from MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Sph*I. The blot was probed with PV-GHBK11, the source plasmid for the linear DNA segment used in transformation. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected size bands at 3.9 and 4.8 Kb; an additional faint band at 8.7 Kb in lane 5 is presumably due to undigested plasmid DNA. The DP50B long and short runs produced three bands at approximately 6.4, 8.3, and 8.6 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs each produced two bands not present in the

DP50 or the DP50B lanes at approximately 2.3 Kb and 3.5 Kb. Because the enzyme *SphI* cuts only once within the transformation cassette, this result suggests that MON15985 contains one copy of integrated DNA which produces these two restriction fragments.

DNA from the test, controls, and control mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *NcoI* to release the *cry2Ab* coding region and assess its intactness. The blot was probed with the full-length *cry2Ab* coding region. As expected, the DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected ~1.9 Kb band which corresponds to the entire *cry2Ab* coding region. Both the MON15985 long and short runs also produced a 1.9 Kb band which corresponds to the expected size of an intact *cry2Ab* coding region. This result establishes that event MON15985 contains the intact *cry2Ab* coding region, with no additional detectable fragments.

DNA from the test, controls, and control mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Bam*HI which releases the entire cassette encoding Cry2Ab (i.e. *cry2Ab* coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, and the NOS 3' polyadenylation sequence).

The blot was probed with the full length *cry2Ab* coding region. The DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected 3.2 Kb band which corresponds to the entire cassette encoding Cry2Ab. Both the MON15985 long and short runs produced a band at approximately 4.0 Kb. This result indicates that the 3' end of the transformation cassette lost the *Bam*HI restriction site during integration into the cotton genome. The 3' sequence of the insert-to-plant junction, previously determined by genome walking, was verified by PCR analysis. Sixty-six base pairs of the 3' end of the transformation cassette were shown to have been deleted, including the *Bam*HI site. The deleted nucleotides do not include any of the NOS 3' polyadenylation sequence associated with the cassette encoding Cry2Ab, but only linker DNA. These results establish that the cassette encoding Cry2Ab is intact. No partial cassettes derived from that encoding Cry2Ab were detected.

The blot used above was stripped and re-probed with the full length enhanced CaMV 35S promoter. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected size bands at 5.5 and 3.2 Kb with no additional bands detectable. The DP50B long and short runs produced five bands at

36
36

approximately 4.4, 5.3, 7.5, 9.4, and 22 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs both produced one band at approximately 4.0 Kb which is not present in either the DP50 or the DP50B lanes. This corresponds to the fragment predicted for the cassette encoding Cry2Ab given the result obtained with the *cry2Ab* coding region probe. A second band in the MON15985 lanes resulting from hybridization to the enhanced CaMV 35S promoter associated with the cassette encoding UidA (GUS) is predicted but not apparent in the test lanes. The results of the NOS 3' polyadenylation sequence probe, discussed below, demonstrate that the enhanced CaMV 35S promoter sequence associated with the UidA encoding cassette is present, but the 4.4 Kb band co-migrates with a 4.4 Kb background band and is not apparent. No extraneous promoters were detected.

The blot used above was re-stripped and re-probed with the full length NOS 3' polyadenylation sequence. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 5.5 and 3.2 Kb with no additional bands detectable. The DP50B long and short runs produced one band at approximately 1.2 Kb. Since this band is present in both event MON15985 and the DP50B control it is considered background associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs each produced two bands which are not present in the DP50 or the DP50B lanes at approximately 4.0 and 4.4 Kb. The 4.0 Kb band corresponds to the fragment predicted for the cassette encoding Cry2Ab, given the result from above. The 4.4 Kb band was not apparent on the blot probed with the enhanced CaMV 35S promoter because it co-migrates with the 4.4 Kb background band seen on that blot. This segment is associated with the *uidA* cassette.

These results establish that the Cry2Ab encoding cassette is intact and that there is a 66 bp deletion between the *Bam*HI site and the 3' end of the transformation cassette, which does not include any of the NOS 3' polyadenylation sequence at the 3' end of the cassette encoding Cry2Ab. No partial cassettes derived from that encoding Cry2Ab were detected.

Genomic DNA isolated from MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Eco*RI and *Bgl*II to release the entire *uidA* coding region. The blot was probed with the full-length *uidA* coding region. The DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected ~1.9

Kb band which corresponds to the entire *uidA* coding region. Both the long and short runs of event MON15985 DNA also produced a 1.9 Kb band which corresponds to the expected size of an intact *uidA* coding region. This result establishes that event MON15985 contains the intact *uidA* coding region, with no additional fragments detected.

DNA from the test and control substances was digested with *Bam*HI and *Sph*I to release the entire *uidA* cassette (i.e. *uidA* coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, and the NOS 3' polyadenylation sequence). The plasmid PV-GHBK11 was digested with *Pst*I and spiked into the DP50 short run samples after digestion (except for the NOS 3' polyadenylation sequence probe blot in which the plasmid was digested with *Bam*HI and *Sph*I). This was done to show the size of an intact full-length *uidA* cassette.

The blot was probed with the full length *uidA* coding region. As expected, the DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected 2.8 Kb band which corresponds to the entire *uidA* cassette. Both the MON15985 long and short runs produced an approximately 2.5 Kb band. This result indicates that a portion of the *uidA* cassette was not present. The 5' insert-to-plant junction, previously determined by genome walking, was verified by PCR analysis. It had been demonstrated previously that 284 bp of the 5' portion of the transformation cassette were deleted. These results establish that the *uidA* cassette is missing approximately 260 bp of the 5' promoter sequence and 24 bp of polylinker DNA derived from the multiple cloning site of the plasmid. Odell et al. (1985) showed that such a deletion should not affect accurate transcription initiation. No additional partial *uidA* cassettes were detected with the *uidA* coding region probe.

The blot used above was stripped and re-probed with the full length enhanced CaMV 35S promoter. The DP50 long run did not produce any background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 1.5 and 2.8 Kb with no additional bands detected. The DP50B long and short runs produced five bands at approximately 4.3, 4.6, 5.0, 6.6, and 8.5 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs each produced two bands at approximately 2.5 and 1.0 Kb not present in the DP50 or the DP50B lanes. The 2.5 Kb band corresponds to the fragment predicted for the *uidA* cassette. The 1.0

Kb band results from the enhanced CaMV 35S promoter associated with the cassette encoding Cry2Ab. No extraneous promoters were detected.

The blot was probed with the full length NOS 3' polyadenylation sequence. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 3.8 and 2.2 Kb with no additional bands detected. The DP50B long and short run produced one band at approximately 1.2 Kb. Since this band is present in both event 15985 and the DP50B control it is considered background associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs each produced two bands not present in the DP50 or the DP50B lanes at approximately 2.5 and 2.3 Kb. The 2.5 Kb band corresponds to the fragment predicted for the *uidA* cassette. The 2.3 Kb band results from NOS 3' polyadenylation sequence associated with the cassette encoding Cry2Ab.

These results confirm that the *uidA* cassette is missing approximately 260 bp of the 5' end of the enhanced CaMV 35S promoter but is otherwise intact.

Genomic DNA isolated from event MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Kpn*I. The blot was probed with the entire backbone sequence. The DP50 long run showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 DNA produced one band at the expected size of 2.6 Kb for the entire backbone. The DP50B long and short run produced a single band at approximately 22 Kb. Since this band is present in both event MON15985 and the DP50B control it is considered background associated with the MON531 event. The MON15985 long and short runs contained the 22 Kb background band with no additional hybridization. This result establishes that event MON15985 does not contain any detectable plasmid backbone sequence.

PCR was performed on genomic DNA to confirm the insert-to-plant junction sequences at the 5' and 3' ends of the MON15985 insert. As expected, the non-transgenic samples did not yield a PCR product when either the 5' or 3' primer set was used. The DP50B sample used as the control did not yield products with either primer pair, as expected. A different event prepared using the same construct and selected for expression of Cry2Ab, MON15813, also did not yield products when either primer set was used. The MON15985 genomic DNA yielded the correct size products when 5' end using primer pairs and 3' end primer pairs. This PCR analysis confirmed the 5' and 3' border sequences of MON15985.

The insect protected cotton event MON15985 was produced by particle acceleration technology using a *KpnI* DNA segment containing a cassette encoding Cry2Ab and UidA. The MON15985 event contains a single DNA insert located on a 9.3 Kb *ScaI* fragment. This insert contains one complete copy of the inserted cassette which is missing approximately 260 bp at the 5'end of the enhanced CaMV 35S promoter driving expression of the UidA coding sequence. PCR was used to verify the 5' and 3' junction sequences of the insert with the plant genome, as well as the intactness of the 5' and 3' ends of the insert. Event MON15985 does not contain any detectable plasmid backbone sequence resulting from the transformation event. Based on the enzymes used in this study, the restriction pattern of the *cry1Ac* insert is not changed by the insertion of the DNA inserted comprising the *cry2Ab* coding sequence.

Thus, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18 and sequences comprising these sequences, are diagnostic for the insertion which gave rise to cotton event MON15985. With reference to Figure 1, these sequences are reference numbers 2, 4, 6, 9, and 11 respectively.

All publications and patent applications mentioned in this specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claim.

40

CLAIMS:

1. An insect resistant cotton plant, or parts thereof, seed of said cotton plant having been deposited with the American Type Culture Collection under accession number PTA-2516.

2. An insect resistant cotton plant, or parts thereof, wherein DNA having at least one nucleotide sequence selected from the group of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18 forms part of the plant's genome.

3. A descendant plant of the insect resistant cotton plant of claim 1 wherein DNA having at least one nucleotide sequence selected from the group of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18 forms part of the plant's genome.

4. Seed of a plant of Claims 1, 2, or 3.

5. A method of producing an insect resistant cotton plant comprising breeding with a plant of any of claims 1, 2, or 3, and selecting progeny by analyzing for at least one nucleotide sequence selected from the group of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18.

6. An isolated DNA sequence comprising SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18.

7. An isolated DNA sequence comprising SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:36.

8. A pair of isolated DNA sequences, each comprising at least ten nucleotides and which when used together in a DNA amplification procedure will produce an amplicon diagnostic for MON15985.

9. The pair of isolated DNA sequences of Claim 8 wherein each is chosen from SEQ ID NO:11.

10. The pair of isolated DNA sequences of Claim 8 wherein each is chosen from SEQ ID NO:12.

11. A method of detecting the presence of the MON15985 insertion in cotton tissue comprising:

(a) selecting a primer pair each comprising at least ten nucleotides from SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12 wherein each member of the pair is on opposite sides of a sequence diagnostic for said MON15985 insertion;

(b) contacting a sample of said cotton tissue with said primer pair;

(c) performing DNA amplification and analyzing for an amplicon.

12. The method of Claim 11 wherein said primer pair is selected from the group consisting of SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, and SEQ ID NO:36.

13. A method of detecting the presence of the MON15985 insertion in cotton tissue comprising:

(a) contacting a sample of said cotton tissue with a polynucleotides probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with one or more DNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18;

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

(c) analyzing for hybridization of the probe.

14. A DNA detection kit comprising a polynucleotides probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with one or more DNA sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18.

15. A DNA detection kit comprising a primer pair each comprising at least ten nucleotides from SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12, wherein each is on opposite sides of a sequence diagnostic for the MON15985 insertion.

16. The DNA detection kit of Claim 15 wherein said primer pair is selected from the group consisting of SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, and SEQ ID NO:36.

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

ABSTRACT

The present invention provides cotton plants, cotton tissues, and cotton seeds that include the MON15985 event, which confers resistance to *Lepidopteran* insect damage. Also provided are assays for detecting the presence of the MON15985 event based on the DNA sequence of the recombinant construct inserted into the cotton genome that resulted in the MON15985 event and/or the genomic sequences flanking the insertion site.

SEQUENCE LISTING

<110> Monsanto Technology LLC
Huber, Scott A.
Sean, Doherty C.
Roberts, James K.
Shappley, Zacchary W.

<120> Cotton Event 15985 and Compositions and Methods for Detection Thereof

<130> 38-21 (52211) WO MOBT:232P

<140> US 60/297406
<141> .2001-06-11

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

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

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> sequence comprising a junction between insert DNA and cotton chromosome

<400> 1
gcgtttctgg ttataatata 20

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

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> sequence comprising a junction between insert DNA and cotton chromosome

<400> 2
cttctctgct aagtgggtca

20

<210> 3
<211> 1104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> .(1)..(1104)
<223> completely synthetic sequence

<400> 3
agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca 60
tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt 120
actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg 180
taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg 240
ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca 300
ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa 360
cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac 420
acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg 480
taggcacctc cgtacttctc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540
ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600
tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660
accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 720
cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 780
aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 840
acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 900
atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 960
tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1020
ttgtccctcc actttcttct tgct 1080
1104

<210> 4
<211> 309
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 4
aagtgggtca gtggggtggc attggttttt aatttcaacg cgttttgtcg catatacttt 60
tatgattggg gttttctctt ggtgtacatc aatgaccttc cctattgcat tgtctgaatt 120
ttcatctctt aaatcggcta aaaaacaact atgaaaaaaa gagtaggcct actcatccgt 180
accggggagg gggggggaa tggaggaaat agaatagggg actcatttat atatatataa 240
accaagtatg ttattggttg atcgagtggg aaggaattca atgttcaatt ctgggtttga 300
aacttgctt 309

<210> 5

<211> 378
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(378)
<223> completely synthetic sequence

<400> 5
ccctcaaat gtcaataggt gcgcccctca tctgtcagca ctctgcccct caagtgtcaa 60
ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact 120
tatccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc 180
gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt 240
caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgccctc atctgtcagt 300
gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg 360
cttcgacggc gttttctgg 378

<210> 6
<211> 211
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 6
ttataatata cacatatata atttatcact gtatattctt gcagagaaca atcacgaggc 60
attggccccc ccatttttct aaaaaaaatt tgatctgata gagaaaagaa agaaagaaaa 120
agaagaatat tagtgacctt tcaatggtga aaaatcaaaa aaaaatctca tttaatgata 180
aacaaaatgt caaacagtct gacagctcct g 211

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthetic sequence

<400> 7
gccaatgcct cgtgattgtt ctctgc 26

<210> 8

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

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthetic sequence

<400> 8
gatttgcgag gctggccagc tccacg 26

<210> 9
<211> 589
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(378)
<223> MON531 3' insert sequence, completely synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (379)..(589)
<223> MON531 3' end Gossypium hirsutum flanking sequence

<400> 9
```
ccccctcaaat gtcaataggt gcgccccctca tctgtcagca ctctgccccct caagtgtcaa     60
ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact     120
tatcccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc     180
gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt     240
caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgcccctc atctgtcagt     300
gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg     360
cttcgacggc gttttctggtt ataatataca catatataat ttatcactgt atattcttgc     420
agagaacaat cacgaggcat tggccccctcc attttttttaa aaaaaatttg atctgataga     480
gaaaagaaag aaagaaaaag aagaatatta gtgacctttc aatggtgaaa aatcaaaaaa     540
aaatctcatt taatgataaa caaaatgtca aacagtctga cagctcctg                 589
```

<210> 10
<211> 1411
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1104)
<223> completely synthetic insert sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1105)..(1141)
<223> MON531 5' end Gossypium hirsutum flanking sequence

<400> 10
agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca 60
tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt 120
actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg 180
taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg 240
ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca 300
ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa 360
cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac 420
acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg 480
taggcacctc cgtactcttc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540
ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600
tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660
tagcctctac ctggacagac tctaacctct tgggacactt cagcttccca ctcaggcaca 720
accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 780
cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 840
aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 900
acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 960
atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 1020
tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1080
ttgtccctcc acttctttct tgctaagtgg gtcagtgggg tggcattggt ttttaatttc 1140
aacgcgtttt gtcgcatata cttttatgat tggggtttct ctttggtgta catcaatgac 1200
cttccctatt gcattgtctg aatttttcatc tcttaaatcg gctaaaaaac aactatgaaa 1260
aaaagagtag gcctacttcat ccgtaccggg gagggggggg ggaatggagg aaatagaata 1320
ggggactcat ttatatatat ataaaccaag tatgttattg gttgatcgag tgggaaggaa 1380
ttcaatgttc aattctgggt ttgaaacttg c 1411

<210> 11
<211> 2257
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(361)

<223> Gossypium hirsutum 5' end genomic DNA sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (362)..(750)
<223> 5' end chloroplast related DNA sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (751)..(1885)
<223> 5' end Gossypium hirsutum remnant DNA sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1886)..(2267)
<223> 5' end inserted DNA sequence

<400> 11
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60
taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120
tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180
ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240
ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300
ggactatagg gcctagtggt agtcaacagg ccgggcggga aagtattcat ttgaaatggg 360
tttattcgta ttaacagcta ctctaggagg aatgttttta tgcggtgcta acgatttaat 420
aactatcttt gtagctccag aatgtttcag tttatgctcc tacctattat ctggatatac 480
caagaaagat gtacggtcta atgaggctac tacgaaatat ttacttcatgg gtggggcaag 540
ctcttctatt ctggttcatg gtttctcttg gctatatggt tcatccgggg gagagatcga 600
gcttcaagaa atagtgaatg gtcttatcaa tacacaaatg tataactccc caggaatttc 660
aattgcgctt atattcatca ctgtaggaat tgggttcaag ctttccccag ccccttctca 720
tcaatggact cctgacgtat acgaaggagt tcttttaggc ttttgcattt tgttgaaaat 780
tcttattttc acaggacttt gcttatcata attattgaca gccaactggt gaaaatggtg 840
ccacgagagc tcccatcagc attgatttgg ctagggatag ttctttaagt gctaagtcaa 900
tcatcttgca aattgacaat aaatctcaac aggtttcagc aagtaaggcc tccttcatta 960
ttttggttgc ttctttttca ttaatgatgt tgcttgtttg cacctggaaa acatgcaccg 1020
ttcttcatca tgcaccttgg atatggtctt gagtgctctc tgactgcccg tcatctttcg 1080
aattggtgtc tgattgagtg cacccgccta agttcaagat gccggagttt gaatagtata 1140
acgggactag ttgtcttgag gctcatatta ctatgttctg tcgatataat catccatggg 1200
cttcgcatcc accattgcaa ggcccaacca cctagcactg tgatgggtcc aaacgcaaag 1260
gtgatccctt taggccaaat ggatggagac gctataagat tggtcaccgc aagaaaagtg 1320
tggatcgata ggccctgtag ttgatgatgg ggatgatcac gatgaccctg cctatcctcc 1380
aagtttcacc ccaactaaca tccaagtgca accagaggtg tacccgcaga gggcacctat 1440
taccattaga tcgactgcaa gtgtaggtaa tgttggacag ggtagatcag ggtgttcacg 1500
gtgtggtaga ctttactatg gtcctttttcg ggcaggcgaa aatgtttgtt ataaatgcgg 1560
cactccagat cattttgtac gagaatgtcc agaggtggct aatcgagaga atcgaattac 1620
ttacgaaaaa agattattgt tactaagttt tcatgttttа tgccatgcgt agccatgttt 1680
ttaataaagg gttgaagact tgaatgacaa gttagcgtaa agcatttttt ttcttttcatg 1740
ttggcacatt tgatgcacta tgtcttcgtc tatttttcaa acatactgtt ggaagaatta 1800
tgattcacgt gttgtttaag atcaaaaagt gcatgcctaa ctaatacttа tcagaaacaa 1860
ataatgcaat gagtcatatc tctataaagg gtaatatccg gaaaccтcct cggattccat 1920

tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctcctacaaa 1980
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtggtccc 2040
aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 2100
tcaaagcaag tggattgata tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac 2160
tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gaggacacgc 2220
tgacaagctg actctagcag atctccatgg tccgtcctgt agaaacc 2267

<210> 12
<211> 1360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> .Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(349)
<223> 3' end insert sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (350)..(673)
<223> 3' end Gossypium hirsutum remnant DNA sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (674)..(1360)
<223> 3' end Gossypium hirsutum chromosomal sequence

<400> 12
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag gagctctgat ccccatggga attcccgatc 60
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 120
ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 180
cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga 240
tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaatttatc gcgcgcggtg tcatctatgt 300
tactagatcg gggatatccc cgggggcggcc gctctagaac tagtggatct gcactgaaat 360
cccatccatt tagcaacctt aaaagtaata aacttaaact aagtgtactc cttatcaaaa 420
cataaaccaa gagatgagga taacagcgtt cggccaaccc caataccacc tataatcaaa 480
gcatgcgatg tcacgaacgt tttcctgacg gcaatcgaca caaagaagag attaaaaagg 540
gagaccacta tagaaagaag aaagagaatc ggcaccactg tgaaactaca tttgataacc 600
gtattagcaa ggctccacca ttgataaaaa ctcgacaacc aagaggaact cacttacctt 660
gatcaaagta gggttgttgg tactaaggct caaagcaagg aaaatgtcta aatgagtgag 720
ttgggctttt ttaatttaat taaactgaaa aataagaaag gatgttgcca attttgtgtg 780
gcaaggacgg acaagaggtt tcgacccaac ctagagaaga cattaaaact gcagaactgg 840
gctcgcttgt tcaggatcgg gctttaaagg agaatggttt gatggaccag aatagagaca 900
aaccaataca ctcagatttt gatcttcctt attctccctc aactattgat tttgttttgg 960
gtaatgatgg tgtagcaggg gatcgggttt taggtgtttt tcaaggcatg actgttactc 1020
attttaatcc gacttgcgat gaccataatg agatggaggc tgtactgaag gatgaagtat 1080
tggatccaaa taggcattcg acatgtttga taaaactctt agttacaaaa ttcttagtaa 1140

acgaatccat aaggttatct ttagatgtta ttttcatcac atctataatt ctttcagcta 1200
ctgcctcttg tatcaagtga tactttcagt cagtatattc gtcttgcagc actgttatca 1260
caatacagtg ttatatcttt ttctatatca ggaatgactt caagatcggt taagaacttt 1320
taaagccata ttgtttcttt cgtagcctca gaagcaacca 1360

<210> 13
<211> 1050
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 13
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60
taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120
tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180
ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240
ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300
ggactatagg gcctagtggt agtcaacagg ccgggcggga aagtattcat ttgaaatggg 360
ttgttgttgg tactaaggct caaagcaagg aaaatgtcta aatgagtgag ttgggctttt 420
ttaatttaat taaactgaaa aataagaaag gatgttgcca attttgtgtg gcaaggacgg 480
acaagaggtt tcgacccaac ctagagaaga cattaaaact gcagaactgg gctcgcttgt 540
tcaggatcgg gctttaaagg agaatggttt gatggaccag aatagagaca aaccaataca 600
ctcagatttt gatcttcctt attctccctc aactattgat tttgttttgg gtaatgatgg 660
tgtagcaggg gatcgggttt taggtgtttt tcaaggcatg actgttactc attttaatcc 720
gacttgcgat gaccataatg agatggaggc tgtactgaag gatgaagtat tggatccaaa 780
taggcattcg acatgtttga taaaactctt agttacaaaa ttcttagtaa acgaatccat 840
aaggttatct ttagatgtta ttttcatcac atctataatt ctttcagcta ctgcctcttg 900
tatcaagtga tactttcagt cagtatattc gtcttgcagc actgttatca caatacagtg 960
ttatatcttt ttctatatca ggaatgactt caagatcggt taagaacttt taaagccata 1020
ttgtttcttt cgtagcctca gaagcaacca 1050

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' event end cotton genome sequence flanking chloroplast related sequence

<400> 14
tgaaatgggt ttattcgtat 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' end chloroplast related sequence adjacent to 5' end cotton genome sequence

<400> 15
acgaaggagt tcttttaggc #14

20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' end cotton genomic remnant sequence adjacent to 5' end insert sequence

<400> 16
atatctctat aaagggtaat #15

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 3' end insert sequence at NOS3' adjacent to 3' end cotton genomic

<400> 17
ctagtggatc tgcactgaaa #16

20

<210> 18

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

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 3' end cotton genomic remnant sequence adjacent to 3' end Gossypium hirsutum chromosome sequence

<400> 18
tcaaagtagg gttgttggta

20

<210> 19
<211> 361
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 19
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60
taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120
tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180
ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240
ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300
t 360
361

<210> 20
<211> 389
<212> DNA
<213> unidentified plant

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(389)
<223> chloroplast related DNA sequence adjacent to 5' flanking Gossypium hirsutum sequence

<400> 20
ttattcgtat taacagctac tctaggagga atgtttttat gcggtgctaa cgatttaata 60
actatctttg tagctccaga atgtttcagt ttatgctcct acctattatc tggatatacc 120
aagaaagatg tacggtctaa tgaggctact acgaaatatt tactcatggg tggggcaagc 180
tctttctattc tggttcatgg tttctcttgg ctatatggtt catccggggg agagatcgag 240
ctttcaagaaa tagtgaatgg tcttatcaat acacaaatgt ataactcccc aggaatttca 300
attgcgctta tattcatcac tgtaggaatt gggttcaagc tttccccagc ccctttctcat 360
caatggactc ctgacgtata cgaaggagt 389

<210> 21
<211> 1135
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 21
tcttttaggc ttttgcattt tgttgaaaat tcttatttttc acaggacttt gcttatcata 60
attattgaca gccaactggt gaaaatggtg ccacgagagc tcccatcagc attgatttgg 120
ctagggatag ttctttaagt gctaagtcaa tcatcttgca aattgacaat aaatctcaac 180
aggtttcagc aagtaaggcc tccttcatta ttttggttgc ttctttttca ttaatgatgt 240
tgcttgtttg cacctggaaa acatgcaccg ttcttcatca tgcaccttgg atatggtctt 300
gagtgctctc tgactgcccg tcatcttttcg aattggtgtc tgattgagtg cacccgccta 360
agttcaagat gccggagttt gaatagtata acgggactag ttgtcttgag gctcatatta 420
ctatgttctg tcgatataat catccatggg cttcgcatcc accattgcaa ggcccaacca 480
cctagcactg tgatgggtcc aaacgcaaag gtgatcccct taggccaaat ggatggagac 540
gctataagat tggtcaccgc aagaaaagtg tggatcgata ggccctgtag ttgatgatgg 600
ggatgatcac gatgaccctg cctatcctcc aagtttcacc ccaactaaca tccaagtgca 660
accagaggtg tacccgcaga gggcacctat taccattaga tcgactgcaa gtgtaggtaa 720
tgttggacag ggtagatcag ggtgttcacg gtgtggtaga ctttactatg gtccttttcg 780
ggcaggcgaa aatgttttgtt ataaatgcgg cactccagat cattttgtac gagaatgtcc 840
agaggtggct aatcgagaga atcgaatcac ttacgaaaaa agattattgt tactaagttt 900
tcatgtttta tgccatgcgt agccatgttt ttaataaagg gttgaagact tgaatgacaa 960
gttagcgtaa agcatttttt ttctttcatg ttggcacatt tgatgcacta tgtcttcgtc 1020
tatttttcaa acatactgtt ggaagaatta tgattcacgt gttgtttaag atcaaaaagt 1080
gcatgcctaa ctaatactta tcagaaacaa ataatgcaat gagtcatatc tctat 1135

<210> 22
<211> 382
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(382)
<223> completely synthesized 5' end insert sequence corresponding to enhanced 35S promoter sequence

<400> 22
aaagggtaat atccggaaac ctcctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg 60
tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg 120
ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccca cccacgagga 180
gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatatgata 240
tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta 300
tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaca agctgactct agcagatctc 350
catggtccgt cctgtagaaa cc 382

<210> 23

<211> 349
<212> DNA
<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 23
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag gagctctgat ccccatggga attcccgatc 60
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 120
ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 180
cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga 240
tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt 300
tactagatcg gggatatccc cgggggcggcc gctctagaac tagtggatc 349

<210> 24
<211> 323
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 24
tgcactgaaa tcccatccat ttagcaacct taaaagtaat aaacttaaac taagtgtact 60
ccttatcaaa acataaacca agagatgagg ataacagcgt tcggccaacc ccaataccac 120
ctataatcaa agcatgcgat gtcacgaacg ttttcctgac ggcaatcgac acaaagaaga 180
gattaaaaag ggagaccact atagaaagaa gaaagagaat cggcaccact gtgaaactac 240
atttgataac cgtattagca aggctccacc attgataaaa actcgacaac caagaggaac 300
tcacttacct tgatcaaagt agg 323

<210> 25
<211> 688
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum

<400> 25
gttgttggta ctaaggctca aagcaaggaa aatgtctaaa tgagtgagtt gggctttttt 60
aatttaatta aactgaaaaa taagaaagga tgttgccaat tttgtgtggc aaggacggac 120
aagaggtttc gacccaacct agagaagaca ttaaaactgc agaactgggc tcgcttgttc 180
aggatcgggc tttaaaggag aatggtttga tggaccagaa tagagacaaa ccaatacact 240
cagattttga tcttccttat tctccctcaa ctattgattt tgttttgggt aatgatggtg 300
tagcagggga tcgggtttta ggtgtttttc aaggcatgac tgttactcat tttaatccga 360
cttgcgatga ccataatgag atggaggctg tactgaagga tgaagtattg gatccaaata 420
ggcattcgac atgtttgata aaactcttag ttacaaaatt cttagtaaac gaatccataa 480
ggttatcttt agatgttatt ttcatcacat ctataattct ttcagctact gcctcttgta 540
tcaagtgata ctttcagtca gtatattcgt cttgcagcac tgttatcaca atacagtgtt 600
atatcttttt ctatatcagg aatgacttca agatcggtta agaacttttа aagccatatt 660
gttttctttcg tagcctcaga agcaacca 688

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized

<400> 26
gtggcccagg ggaataaaa

19

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> completely synthesized

<400> 27
ttgcgaagga tagtgggatt gtg

23

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized

<400> 28
taatacgcga tagaaaacaa aata

24

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized

<400> 29
ctaaaacccg atcccctgct acac

24

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> .Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> completely synthesized

<400> 30
gactgaatgc ccacaggccg tcgagtt

27

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthesized

<400> 31
cctgaacttct ggcacccagt tcgacc

26

<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> completely synthesized

<400> 32
ggtttctaca ggacggacca tggagatctg c

31

<210> 33
<211> 31
<212> DNA
<213> Artifical

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> completely synthesized

<400> 33
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag g

31

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized

<400> 34
tggttgcttc tgaggctac

19

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized

<400> 35
cttgtcattg gtgcagacag gttc 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized

<400> 36
gcttcaccat ctctccaatc cacg 24

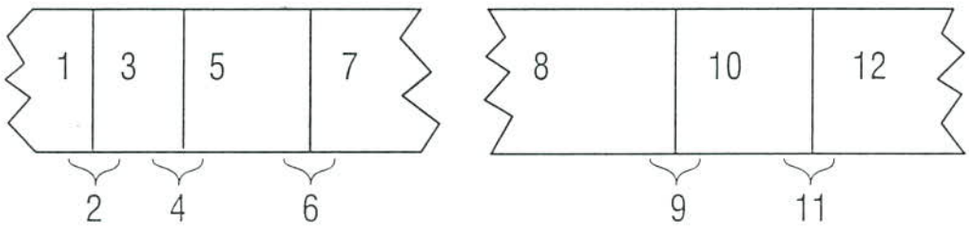


FIG. 1

-61
60

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000000 Folios: 62
Fecha (AMD): 2002-06-11 16:57:58
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 34,500
FECHA : MAYO 27 DE 2002

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOS...TE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVE...ER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894480	27/05/2002	33,344,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
		TOTAL : $	378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Blo 12746-801-002-1

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

68
61

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000000
Fecha (AMD): 2002-06-11 16:57:58 Folios: 62
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 33.591
FECHA : MAYO 23 DE 2002

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVEL. ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894479	23/05/2002	9.928.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106.000.00
		TOTAL : $	106.000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Cslo 12746-001-002-1

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

62
62

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000000 Folios: 62
Fecha (AMD): 2002-06-11 16:57:58
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN [✓]	**MODELO DE UTILIDAD**	[ ]	[✓]
• Indicación de que se solicita la concesión de una patente		[ ]	[✓]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		[ ]	[✓]
• Descripción de la invención		[ ]	[✓]
• Dibujos de ser estos pertinentes		[ ]	[✓]
• Comprobante de Pago de las tasas establecidas		[ ]	[✓]
COMPLETA [✓]	INCOMPLETA	[ ]	[ ]
DISEÑO INDUSTRIAL [ ]			
• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.		[ ]	[ ]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.		[ ]	[ ]
• Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño .		[ ]	[ ]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.		[ ]	[ ]
COMPLETA [ ]	INCOMPLETA	[ ]	[ ]
ESQUEMA DE TRAZADO [ ]			
• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.		[ ]	[ ]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.		[ ]	[ ]
• Representación gráfica del esquema de trazado		[ ]	[ ]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.		[ ]	[ ]
COMPLETA [ ]	INCOMPLETA	[ ]	[ ]

Firma Responsable

Fecha:_____.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 2 mezzanine
Conmutador: 382 08 40
Fax: 350 52 20 e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

Oficio No. 13048

REFERENCIA:

Radicación	02-49630
Trámite	002
Evento	001
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

- Aportar la traducción de la solicitud presentada como solicitud colombiana

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 JUL. 2002

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que las expidió y, en el caso en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada

202027

CAVELIER
ABOGADOS

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

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

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

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000001 Folios: 89
Fecha (AMD): 2002-06-14 17:28:13
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comer
E. S. D.

Referencia : Expediente No. 02049630

Solicitante : **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Asunto : Solicitud de patente para: **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO"**

Fecha de Solicitud : 11 de Junio de 2000

TRÁMITE :002 EVENTO :001 ACTUACIÓN:329

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, presento junto con este escrito la traducción en español de la solicitud en referencia.

2. Atentamente solicito que se continúe con el trámite de esta solicitud.

Bogotá 14 JUN 2002
Señora Jefe;

EMILIO FERRERO
T.P.A No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
MRE/ID-000007/WPC12746

EVENTO DEL ALGODÓN MON 15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA LA DETECCIÓN DE ESTE.

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense 60/297,406, presentada en junio 12, 2001.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se encuentra en el campo de la biología molecular vegetal, y en particular con la protección de insectos y la reproducción de plantas, y esta dirigida a un evento de transformación novedoso de plantas de algodón, Gossypium hirsutum, que comprende una secuencia de polinucleotido insertada en un sitio específico dentro del genoma de una célula de algodón, dicha secuencia codifica una proteína inhibitoria de insecto lepidóptero Cry2Ab. Adicionalmente, la invención se relaciona con plantas de algodón derivadas de aquel evento de transformación y con ensayos para detectar la presencia del evento en una muestra.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con un evento de una planta de algodón resistente al Lepidóptero previamente comercializada, conocida como MON531, que expresa una forma quimérica de una proteína inhibitoria de insectos Cry1A. Las plantas de algodón son susceptibles a la infestación por insecto en todas las áreas del mundo en las cuales se cultivan las plantas. La tecnología de ADN recombinante se ha aplicado a las células de la planta de algodón durante aproximadamente una década, y las plantas de algodón que exhiben características mejoradas como resultado de la inserción de las secuencias de ADN heterólogo se han producido utilizando tecnología de ADN recombinante desde aproximadamente el inicio de los años 90. Algunas de las mejoras exhibidas por las plantas de algodón recombinantes incluyen tolerancia a los herbicidas, características de fibra mejorada, y resistencia a la insectación por insectos.

Las primeras plantas de algodón recombinantes protegidas de la infestación de insectos Lepidópteros fueron producidas, aprobadas por las agencias regulatorias para la distribución comercial, y subsecuentemente comercializadas en 1996. Estas plantas de algodón contenían una secuencia de ADN que codifica

67

una proteína inhibitoria de insectos lepidóptero Cry1A quimérico, primariamente en un evento MON531. Este trato particular, junto con una secuencia de DN ligada adyacente que codifica un marcador seleccionable, se ha transferido mediante reproducción convencional en un número de variedades de algodón, cada una de las cuales son particularmente adecuadas para la producción mejorada de algodón en diversos sitios geográficos a través del mundo. Estas variedades recombinantes han disfrutado de un tremendo éxito comercial por numerosas razones. Una razón es que la producción por acre de producción de algodón ha mejorado el promedio dramáticamente en razón de la infestación de insectos como resultado de la presencia de la proteína inhibitoria de insecto presente dentro de cada célula de planta de algodón. Otra razón principal del éxito comercial ha sido el trabajo y costo reducido debido a la reducción en la aplicación de pesticidas químicos requerida para proteger el cultivo de la infestación de insectos. Además, la reducción en aplicaciones pesticidas mejora la salud total del ambiente al evitar la aniquilación de los insectos o arácnidos y otras especies que no representan amenaza material para los cultivos en el campo, reduce la carga de toxinas de pesticidas químicos aplicada al ambiente,

le permite al finquero evitar los riesgos asociados con los efectos potencialmente dañosos de la exposición a pesticidas químicos.

Será pronto evidente que un producto con un rango más amplio de eficacia contra insectos seria deseable. Mientras Que se vería como simple del punto de vista de la técnica química proporcionar la combinación de proteínas inhibitorias de insectos para este propósito y posiblemente retardar o evitar la resistencia de toxinas desarrolladas por la población de insectos objetivos, en realidad el desarrollo de una planta que cumple estas características es todo problemática, y requiere un gran trato de los recursos, capacidad técnica, y experimentación de cierto error con el fin de obtener un evento de transformación de una planta recombinante simple que de cómo resultado una planta morfológicamente normal que exhiba la combinación deseada de proteínas inhibidores de insectos producidas en niveles suficientes y en momentos adecuados durante la estación de crecimiento de la planta y en los tejidos en los cuales se alimentan las especies de plagas objetivo.

Así, existe necesidad para el desarrollo y caracterización de plantas de algodón que exhiben las características de resistencia mejorada a los insectos como resultado de la frecuencia de dos o más proteínas inhibitorias de los insectos producida por secuencias de ADN incorporadas dentro del genoma de las células de la planta. Adicionalmente, sería deseable para los rasgos inhibitorios de insectos (i) segregarse independientemente una de la otra, (ii) no originar ningún efecto adverso a la fisiología y metabolismo de la planta, y (ii) tener poco o ningún efecto adverso sobre la producción o calidad de la fibra producida de dicha planta.

Es ventajoso ser capaz de detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruce sexual contiene un transgen de interés. Además, un método para detectar un evento particular puede ser de ayuda para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación pre-mercadeo de las ventas de semillas para producir plantas de cosechas transgénicas y alimentos derivados de tales plantas, por ejemplo, o para el uso del monitoreo ambiental monitoreo de los rasgos del cultivo del campo, o monitoreo de

productos derivados de una cosecha de cultivo, así como también para el uso y el aseguramiento del cumplimiento de las partes sometidas a términos regulatorios y contractuales.

Es posible detectar la presencia de un transgen y desde cualquier método de detección de ácido nucleico conocido en la técnica incluyendo pero no estando limitado a la amplificación térmica (PCR™) o hibridización de ADN utilizando sondas de ácido nucleico. Típicamente, por razón de simplicidad y uniformidad de los reactivos y metodologías para el uso y la detección de una construcción de ADN particular que se ha utilizado para transformar varias variedades de planta, estos métodos de detección generalmente se enfocan sobre elementos genéticos frecuentemente utilizados, tales como, promotores, terminadores, genes guardadores, etc., en razón a que para muchos construcciones de ADN, la región de secuencia de codificaciones intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre eventos separados producidos de la misma construcción de ADN o construcciones muy similares. Estos métodos se pueden utilizar, sin embargo, si la secuencia de ADN cromosómico adyacente al ADN insertado

("flanqueo de ADN) es conocido. Un ensayo de amplificación térmica de evento específico (PCR™) se discute, por ejemplo, en Windels et al. (Med.Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459-462, 1999), que identifican eventos de semilla de soya tolerante al glifosato 40-3-2 que utiliza un conjunto de iniciador de amplificación técnica que se extiende sobre la unión entre el inserto y el ADN de flanqueo. Específicamente, una secuencia que incluye el iniciador proveniente del inserto y una segunda secuencia que incluye el iniciador proveniente del ADN de flanqueo. Tal método fue también desarrollado para el evento MON531 y se somete a una solicitud de patente separada. Sería deseable tener tal método que detectara la presencia del nuevo evento de la presente invención aún en la presencia del evento MON531. Es estas y otras del avance ventajoso se han logrado con la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

El evento de algodón MON531, descrito atrás, se transformó una segunda vez con una construcción genética denominada PV-GHBK11 que comprende la secuencia de codificación para el Cry2Ab, una proteína inhibitoria de

insectos, y un evento de este esfuerzo de transformación ha sido seleccionado para introducción comercial potencial. Este se denomina como MON15985. En razón a que este es un evento de inserción, este segregará del gen cry1Ac insertado del MON531 en reproducción. Una línea de algodón que contiene solo la inserción de MON15985 se denomina como MON15985X. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones de materia para estas líneas de algodón. Estas semillas de algodón comprenden el evento de algodón MONI15985 que fueron depositados en septiembre 29, 2000, en la "American Type Culture Collection" y se designaron con el número de acceso ATCC PTA-2516.

En otro aspecto de la invención, se suministran métodos para aceptar la presencia del evento MONI15985.Se suministran secuencias de ADN que identifican las secuencias de ADN insertados y las secuencias de flanqueo de algodón nativo del MON15985. De estos iniciadores de secuencias de ADN se pueden designar para uso en un ensayo de diagnostico PCR. Iniciadores de ejemplos se proporcionan cuando son los ampliconos producidos mediante el uso de tales iniciadores cuando se amplifican en la presencia de ADN de MON15985.

73

Se debe notar que la detección de un diagnostico de secuencia para la inserción de un evento de algodón MON15985 debe ser insuficiente para responder todas las preguntas acerca de una muestra de semilla particular. La línea de semilla denominada MON15985 contiene tanto aquella inserción como la previa identificada como MON531. De esta manera, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para distinguir entre el MON15985 y el MON15985X, una línea a la que le falta el evento MON531. El método utiliza una o más de los diagnósticos de secuencias previamente conocidas para el MON531.

Una secuencia de unión abarca aquí el punto en el cual el ADN insertado dentro del genoma se une al ADN proveniente del genoma nativo del algodón que flanquea el punto de inserción, la identificación o detección de una o de las otras secuencias de unión en el material genético de la planta que es suficiente para hacer diagnostico de cualquier evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en el evento de algodón MON15985 y longitudes similares de ADN de flanqueo. Ejemplos de tales secuencias de diagnóstico

obvio

son las secuencias de unión 20-mera de la SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17 y SEC ID NO:18; sin embargo, otras secuencias tan pequeñas como de 15 pares base que traslapan la las uniones de las inserciones de las señales de las inserciones y la secuencia geonómica también son diagnóstico y se pueden utilizar. La amplificación del ácido nucleico del ADN genómico del evento, que utiliza a los iniciadores suministrados aquí o designados por un experto en la técnica, producen un amplicon que comprende tales secuencias de ADN diagnóstico. Además, la detección de la unión de oligonucleotidos que se vienen específicamente a la secuencia de diagnóstico descritas aquí son también diagnósticos para el evento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministran pares de iniciadores de secuencias de oligonucleotidos para distinguir el evento de algodón MON15985 del nativo , no transformado, y secuencias no alteradas. En particular, tales pares de iniciadores de secuencia de flanqueo comprenden dos moléculas de ácido nucleico aisladas seleccionadas de la SEC ID NO:11 O alternativamente la SEC ID NO:12, el amplicon del cual traslapará una o más secuencias de unión en el ADN

insertado, descritas con el numero de referencia 2, 4, 6, 9, y 11 de la figura< 1. Por ejemplo, solo podían seleccionar un ácido nucleico aislado que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de aproximadamente 1-361 posiciones de pares base como se establece en la SEC ID NO:11 que proviene de la secuencia de ADN geonómica del algodón que flanquean extremo 5´ de ADN insertado, descrito como referencia 1 en la figura 1, y al menos un ácido nucleico aislado que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de aproximadamente 674-1361 posiciones de pares base como se establece en la SEC ID NO:11 que están dentro del ADN insertado, que se describen con el número de referencia 3 y parte del 5 en la figura 1. Los pares iniciadores adicionales útiles para analizar el evento de algodón MON15985 comprende al menos un ácido nucleico aislado de al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de 1-1885 de SEC ID NO:11 pareados con al menos un ácido nucleico aislado de al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de los nucleótidos 362-2267 de SEC ID NO:11 regresado por un experto en la técnica. Sin embargo Similarmente, los pares iniciadores que pueden de los nucleótidos 1-673 de SEC ID NO:12 y nucleótidos provenientes de los

nucleótidos 350-1361 de SEC ID NO:12, teniendo cada iniciador al menos 15 nucleótidos de largo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan conjuntos de iniciadores específicos que son útiles para la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo. Específicamente, la SEC ID NO:26 y la SEC ID NO:27 son uno de tales conjuntos de iniciadores y se pueden utilizar para producir un amplicon que es diagnóstico para la presencia de ADN MON15985 del evento de algodón. La SEC ID NO:28 y la SEC ID NO:29 son otras de tales corrientes iniciadoras. En contraste, la SEC ID NO:26 y SEC ID NO:29 son capaces de producir un amplicon proveniente de muestras de ADN obtenidas de eventos de algodón diferentes al MON15985, y provenientes de genomas hemizigoutos que comprenden la secuencia tipo silvestre en el cual la secuencia MON15985 integrada desde el genoma así como también la secuencia integrada MON15985 y dicho amplicon parecería ser diagnostico para la ausencia del ADN insertado proveniente del evento del algodón MON15985 en una muestra, y no producir amplicon en una muestra que contiene ADN de aquel evento. Se debe tener precaución al interpretar tal resultado, sin embargo, y un experto en la técnica reconocería que cuando esta

presente como un miembro hemizigoute de un par de cromosomas, el uso de la SEC ID NO:26 y la SEC ID NO:29 como herramienta de diagnóstico para probar un negativo o un positivo puede ser erróneo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia del ADN correspondiente al evento de algodón MON15985 en una muestra. Tal muestra que comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN con un conjunto iniciador que, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN genónico proveniente del evento de algodón MON15985, produce un amplicon que es diagnóstico para el evento de algodón MON15985, produce un amplicon que es diagnóstico para el evento de algodón MON15985; (b) desarrollar una reacción de amplificación del ácido nucleico, produciendo de esta manera el amplicon; (c) detectar el amplicon.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, los métodos para detectar la presencia de ADN que corresponden al evento de algodón MON15985 en una muestra, tales métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una prueba que se

hibridiza bajo condici0nes de hibridización severa con ADN genónico proveniente del evento de algodón MON15985 y que no se hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con el ADN proveniente de una planta de control de algodón; (b) someter la muestra y probar las condiciones hibridización severa; y (c) detectar la hibridización de la prueba al ADN.

Otro aspecto de la presente invención son los métodos y composiciones para detectar la presencia del sitio objetivo, es decir, al menos una de las uniones, identificación a detención de las cuales se diagnosticaría para la presencia del ADN integrado con el genónico de la planta de algodón en el evento de algodón MON15985, en una muestra del ácido nucleico derivada preferida del genoma del evento de algodón MON15985, que utiliza una variedad del método detección que incluyen el TAQMAN (Perkin Elmer) o metodología de fluoroforo /apagador relacionadas, amplificación térmica, reacciones en cadena de ligaza, hibridización del sur, métodos de ELISA y métodos de detección colorimétricos y fluorescentes. En particular, la presente invención proporciona juegos para la detección de la presencia de la secuencia objetivo, es decir, al menos una de las

secuencias unión en el evento de algodón MON15985, en una muestra que contiene ácido nucleico genónico proveniente del evento de algodón MON15985. El juego comprende al menos un polinucleotido capas de unirse al sitio objetivo o sustancialmente adyacente al sitio objetivo y al menos unos medios para detectar la unión del polinucleotido al sitio objetivo. Los medios de detección se pueden seleccionar del grupo que consiste de métodos fluorescentes, quimioluminiscentes, colorimétricos, o isotópicos y se pueden acoplar, al menos, con métodos inmunológicos para detectar la unión. También se prevé un método que puede detectar la presencia de un sitio objetivo en una muestra, es decir, al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genónico de la planta de algodón en el evento MON15985, tomando ventaja de dos o más secuencias del polinucleotido que juntas son capaces de unirse a la secuencia del nucleótido adyacente o dentro de aproximadamente 100 pares base, o dentro de aproximadamente 200 pares base, o dentro de aproximadamente 500 pares base, o dentro de aproximadamente 1000 pares base de la secuencia objetivo y se pueden extender una hacia la otra para formar un amplicon que contiene al menos el sitio objetivo.

El anterior y otros aspectos de la invención serán más evidentes de la siguiente descripción detallada y los dibujos que la acompañan.

DIBUJOS

La figura 1 es una representación gráfica de un alineamiento de secuencia para el ADN que esta flanqueando las secuencias insertadas en las secuencias insertadas mismas, que incluyen un gen cry2Ab en el evento de algodón MON15985. El ADN inserto se describe como una simple hebra con 5´ de la izquierda hacia 3´ a la derecha. Las secuencias de ADN individuales identificadas aquí son etiquetadas como sigue: número de referencia 1 es el extremo 5´ que flanquea la secuencia del genoma (SEC ID NO:19) Numero de referencia 2 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia número de referencia de traslapo 1 y 3, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:14; el número de referencia 3 es una secuencia relacionada con el cloroplasto de ADN extraño SEC ID NO:20; el número de referencia 4 que es la secuencia de unión que traslapa las secuencias por el número de referencias 3 y 5, una secuencia de diagnóstico como se establece SEC ID NO:15;

el número de referencia 5 es un remanente a la secuencia del genoma del algodón (SEC ID NO:21); el número de referencia 6 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los números de referencia 5 y 7, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:16; número de referencia 7 es una porción del extremo 5´ de la secuencia intencionalmente insertada (SEC ID NO:22); el número de referencia a 8 es una porción del extremo 3´ de la secuencia intencionalmente insertada (SEC ID NO:23); el número de referencia 9 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los numerales de referencia 8 y 10, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:17; el numero de referencia 10 es otro remanente no insertado intencionalmente de la secuencia genoma del algodón (SEC ID NO:24); el número de referencia 11 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los números de referencia 10 y 12, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:18; y el número de referencia 12 es la secuencia del genoma del algodón que flanquea la 3´, como se establece en la SEC ID NO:25.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

El algodón, Gossypium hirsutum, ha sido genéticamente modificado para resistir las plagas de Lepidópteros, que tienen un impacto negativo sobre la producción del algodón. Esto se logró mediante la inserción de un primer cartucho de ADN que codifica la inserción de la proteína Cry1Ac proveniente del Bacillus thuringiensis y un segundo cartucho dado que codifica la proteína insecticida Cry2Ab proveniente del Basillus thuringiensis. Esta invención se relaciona preferiblemente con plantas, partes de plantas, plantas de progenie que contienen al menos la secuencia que comprenden el segundo cartucho de ADN, y con métodos y composiciones de material para el uso de la detección de la presencia de dichas secuencias en una muestra.

El primer cartucho de ADN se insertó dentro del genoma del cultivar de algodón Coker 312 a través de Agrobacterium sp que se transforma utilizando un segmento de ADN derivado del plasmido PV-GHBK04 (pMON10518 en la patente estadounidense No. 5,500,365)para producir el evento de algodón MON531, que reproducido con muchas diferentes variedades de algodón e introducido exitosamente en los mercados de algodón en todo el mundo. El evento de algodón MON531 se transformó utilizando

tecnología y aceleración de partículas con un fragmento de ADN lineal purificado con gel, es decir, el segundo cartucho indicado aquí y el anterior, proveniente del plasmido PV-GHBK11 (alternativamente denominado pB1579), que contiene el cry2Ab y las regiones que codifican la β-glucuronidasa (uidA). (John, M. E 1997. Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17(3): 185-208) El gel uidA se utilizó como un marcador seleccionable para ayudar en la identificación de células que contenían la región que codifica el cry2Ab. La región que codifica al cry2Ab derivado del plasmido PV-GHBK11 comprende el promotor (CaMV) 35S del virus del mosaico del coliflor con una región mejoradora duplicada (patente U.S 5,530,196; 5,424,200; y 5,359,142) operablemente conectada a una secuencia líder no traducida de una proteína de golpe de calor de petunia (PetHSP70-líder) operablemente conectada o unida al péptido de transito de cloroplasto N-terminal del gen EPSP de la Arabidopsis thaliana (AEPSPS/CTP2) (Van den Broeck, et. Al. 1985. Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Nature 313, 358-63.). Operablemente conectada o unida a una secuencia sintética que codifica

la proteína Cry2Ab (Widner, W. R. y Whiteley, H.R. 1990. Location of the Dipteran Specificity Region in a Lepidopteran-Dipteran Cristal Protein from Bacillus thuringiensis. J Bacteriol. 172, 2826-32) que esta operablemente conectada o unida a la región no traducida 3´ del gen sintasa nopalina (NOS) de Agrobacterium tumifaciens que termina la trascripción y dirige la poliadenilación (Fraley, R.T., et. al. 1983. Expressión of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci U,S,A,, 80 (15), 4803-07). La región que codifica la β-glucuronidasa también es controlada por un promotor CaMV 35S mejorado y una secuencia de poliadenilación NOS 3´. La inserción del cartucho, o sustancialmente todo el cartucho, que contiene las secuencias que codifican el cry2Ab Y el uidA dentro del evento de algodón MON531 dan origen a un evento designado como MON15985 que comprende tanto la secuencia que codifica el cry1A como también el cartucho que codifica la secuencia que codifica cry2Ab. El análisis genético del evento MON15985 ha demostrado que dos cartuchos insertados se encuentran en cromosomas diferentes y así se pueden segregar en la reproducción, los segregantes al lugar al genotipo del evento original MON531 así como también un segundo genético designado como MON15985X que comprende solo un cartucho insertado

simple que comprende el gen responsable para codificar la proteína cry2Ab. Es el evento de transformación el que da origen al genotipo del algodón MON15985 así como también al genotipo MON15985X que es la materia sujeto de esta invención.

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar aquellos de experticio ordinario en la practica de la presente invención. A menos que anote otra cosa, los términos deben ser entendidos de acuerdo con el uso convencional por aquellos expertos en la técnica relevante. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al ., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, quinta edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994. La nomenclatura de las bases de ADN se establecen en 37 CFR § se utiliza 1822.

Que comprende

Como se utiliza aquí, la expresión, "que comprende" significa "que incluye pero no esta limitado a".

EVENTO

Como se utiliza aquí un "evento" transgénico se refiere a una planta recombinante producida mediante la transformación de células vegetales con ADN heterologos, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgen de enteres, regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgen dentro del genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización del genoma particular. El término "eventos" se refiere al transformante y la progenie originales del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "eventos" también se refiere a la progenia producida mediante cruce sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Aun después de repetido el retro cruzamiento de un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN de flanqueo proveniente del padre transformado esta presente en la progenie del cruce lo mismo que el sitio del cromosoma. El término "evento" también se refiere al ADN proveniente del transformante original que comprende el ADN inserto y la secuencia de flanqueo mediatamente adyacente al ADN inserto que se

esperaría fuera transferida a la progenie que recibe el ADN inserto incluyendo el transgen de interés como resultado del cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo el transformante y la progenie originales que resultan de si mismas) y las líneas parentales que no contienen el ADN insertado.

Pruebas e iniciadores

Una "pruebas" es un ácido nucleico aislado el cual esta unido a una etiqueta convencional detectable a una molécula reportera, por ejemplo, un isótopo por radioactivo, ligando agente quimioluminiscente o enzima. Tal prueba es complementaria a una hebra de un ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una hebra de un ADN genómico proveniente de un evento de algodón MON15985 (sea de una planta de algodón o de una muestra que incluye el ADN del evento). La prueba de acuerdo con la presente invención incluye no solo ácidos deoxiribonucleicos o ácido sino también poliamida y otros materiales de prueba que se unen específicamente a la secuencia de ADN objetivo y se pueden utilizar para detectar la presencia de la secuencia de ADN objetivo.

Los "iniciadores" son ácidos nucleicos aislados que fortalecidos en un hebra de ADN objetivos complementario mediante hibridización de ácido nucleico para formar un híbrido entre el iniciador de la hebra de ADN objetivo, luego extendida junto con la hebra de ADN objetivo mediante una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. Los pares de iniciadores o conjuntos se pueden utilizar para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR™), también conocida como métodos de amplificación térmica, y otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Las pruebas y los iniciadores pueden ser tan pequeñas como diez nucleótidos, pero son generalmente de 15 nucleótidos o más de longitud, preferiblemente 20 nucleótidos o más, más preferiblemente 25 nucleótidos, y más preferiblemente 30 nucleótidos o más. Tales pruebas e iniciadores hibridizan específicamente a una secuencia objetivo bajo altas condiciones de hibridización severa. Preferiblemente, las pruebas y los iniciadores de acuerdo con la presente invención tienen complementariedad de secuencia completa con la secuencia objetivo, aunque pruebas diferentes de la secuencia objetivo y que

89
90

requieren la capacidad de hibridizar las secuencias objetivo se pueden se pueden designar mediante métodos convencionales. Cualquier referencia a una secuencia específica para una prueba o iniciador de la secuencia de ADN incluye su secuencia complementaria.

Los métodos para preparar y utilizar pruebas e iniciadores se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook et al., 1989"); Currente Protocols in molecular Biology, ed. Ausubel et el., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 1992 (con fechas periódicas) (en lo sucesivo, " usubel et al., 1992); and Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de iniciadores PCR™ se pueden derivar de una secuencia conocida,
Por ejemplo al ignisar programas de computador destinados para este propósito tal como el Primer (versión 0.5, © 1991, Witehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

90
91

Los iniciadores y las pruebas basadas en el ADN de flanqueo las secuencias de inserto descritas aquí se pueden utilizar para confirmar (y, si es necesario corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, por ejemplo, al reclonar y secuenciar tales secuencias.

Hibridización de ácido nucleico; condiciones severas; específica.

Las sondas e iniciadores de ácido nucleico en la presente invención hibridizan bajo condiciones severas una secuencia de ADN objetivo. Cualquier hibridoización de ácido nucleico convencional cuanto método de amplificación se puede utilizar para identificar la presencia del ADN proveniente del evento transgénico de una muestra.

El término "condiciones severas" que define funcionalmente con relación a la hibridización de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico objetivo (es decir a una secuencia de ácido nucleico particular e interés) mediante el procedimiento

91 87
92

De hibridización específico discutido en Sambrook et al., 1989, a 9.52-955. Ver también, Sambrook et al., 1989 a 9,47-9,52 9.56-9.58; Kanehisa, Nucl. Acids Res. 12:203-213, 1984; y Wetmur y Davidson, J. Mol. Biol. 31:349-370,1968.

En relación con la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, mediante PCRTM) utilizando un par iniciador de amplificación, "condiciones severas" son condiciones que le permiten al par iniciador hibridizar solo la secuencia de ácido nucleico objetivo a la cual el iniciador que tiene la correspondiente secuencia tipo silvestre (o su complemento) se uniría y preferiblemente producir un producto de amplificación único. El término "específico para(una secuencia objetivo)" indica que la sonda o el iniciador hibridiza bajo condiciones de hibridización severas solo la secuencia objetivo en una muestra que comprende la secuencia objetivo.

Amplificación del ácido nucleico

Como se utiliza aquí "el ADN amplificado" o "amplicon" se refiere al producto de amplificación del

ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico objetivo que es parte de una plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de algodón que resulta de un cruce sexual contiene un ADN genómico de un evento transgénico proveniente de una planta de algodón puede ser sometido a una amplificación de ácido nucleico utilizando un par iniciador que incluye un iniciador derivado de la secuencia de flanqueo en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado y un segundo iniciador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicon que es diagnostico para la presencia del evento (por ejemplo, el amplicon es de una longitud y tiene una secuencia que es diagnóstica para el evento). Alternativamente, un par iniciador se puede derivar De la secuencia de flanqueo sobre ambos lados del ADN insertado con el fin de producir un amplicon que incluye un inserto completo.

La amplificación del ácido nucleico se puede lograr mediante cualquiera de los varios métodos de aplicación de ácido nucleico conocidos en la técnica, que incluyen la reacción de cadena de polimerasa (PCR™). Una variedad de métodos de amplificación son conocidos en la técnica y son descritos, Inter. alia, en la patente estadounidense

93 9 8 94

No. 4,683,195 y 4,683,202 y en los protocolos PCR: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego 1990. Cualquier método bien conocido para la amplificación del ácido nucleico se puede utilizar en la práctica de la presente invención.

La secuencia del inserto del ADN heterólogo o secuencia de flanqueo proveniente de un evento de algodón MON15985 se puede verificar (y corregir si es necesario) al amplificar tales secuencias provenientes del evento que utiliza iniciadores derivados de las secuencias suministradas aquí seguidas por una secuenciación de ADN estándar.

Juego de detección.

Como se utiliza aquí, "juego de detección" se refiere a un juego utilizado para detectar la presencia o ausencia de ADN proveniente de un evento MON15985 en una muestra que comprende sondas de ácido nucleico e iniciadores de la presente invención, que hibridizan bajo condiciones severas a una secuencia de ADN objetivo, y otros materiales necesarios para posibilitar la hibridización del ácido nucleico o los métodos de

94/90
95

amplificación. Alternativamente, un juego de detección puede comprender materiales necesarios para posibilitar a un experto en la técnica desarrollar métodos similares a aquellos descritos en la solicitud internacional PCT WO 97/22719, incorporada aquí como referencia, para detectar la presencia o ausencia de ADN proveniente de un evento MON15985 en una muestra.

Ejemplo 1.

El algodón, Gossypium hirsutum ha sido genéticamente modificado para resistir las plagas de lepidópteros, que tienen un impacto negativo sobre la producción del algodón. Esto se logra como se indicó aquí mediante la inserción de un cartucho de ADN que codifica en la proteína cryAc insecticida proveniente del bacillus thuringiensis dentro del genoma del cultivar de algodón Coker 312 a través de la transformación del Agrobacterium sp que utiliza un fragmento del ADN derivado del plasmido PV-GHBK04 (pMON10518 en la patente estadounidense No. 5,500,365). Esta transformación da como resultado tres inserciones separadas dentro del genoma del algodón. La primaria, inserto funcional responsable por la expresión de la proteína cry1Ac en el evento del algodón 531

95
96

comprende el promotor 35S mejorado descrito anteriormente, la región codificante cry1Ac, y la secuencia de terminación unida a una secuencia que codifica un marcador seleccionable antibiótico. Un segundo inserto adyacente y e inmediatamente corriente arriba de la primer secuencia insertada comprende una región que codifica el CRY1Ac parcial y la secuencia de terminación. El tercer inserto comprende solo una secuencia de terminación parcial y ha sido mostrada para segregar independientemente de las primeras dos secuencias indicadas anteriormente. La primera y las segundas secuencias insertadas están estrechamente unidas y por lo tanto no se segregan una de la otra. Los flancos de la secuencia del genoma del algodón los extremos 5´ y 3´ de todos los tres insertos. Por lo tanto, las seis únicas uniones del genoma/inserto del algodón fueron creadas como resultado del proceso de transformación. Cualquiera de las seis uniones puede ser analizada para determinar si el evento MON531 esta presente en una muestra de semillas de algodón.

El análisis molecular se desarrollo sobre el evento de algodón MON531 para definir el extremo de una de las inserciones de ADN transgen e identificar el ADN gnómico

del algodón que flanquea los insertos de ADN transgen. Los estudios que avanzan del genoma combinados con la secuenciación de nucleótidos produce las secuencias de ADN de dos de dichas uniones de genoma/inserto de algodón para el inserto primario SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2 y sus complementos. Las secuencias de flanqueo y el diagnóstico de las secuencias del inserto para el MON531 fueron entonces identificadas como sigue: SEC ID NO:3, la secuencia del extremo 5´ del inserto primario; SEC ID NO:4, la secuencia del genoma del algodón que flanquea el extremo 5´; SEC ID NO:5, la secuencia del inserto en el extremo 3´; y la SEC ID NO:6, la secuencia del genoma que flanquea ese extremo 3´. Como se discutió anteriormente, los iniciadores se pueden derivar de estas secuencias para utilizar métodos de amplificación de ADN. Los ejemplos de SEC ID NO:7 Y SEC ID NO:8. El SEC ID NO:9 es la secuencia de la sección del DNA que traslapa el ADN del genoma del algodón y un extremo del ADN insertado; la SEC ID NO:10 es la secuencia de una sección del ADN que traslapa el ADN del genoma del algodón y el extremo opuesto del ADN insertado.

Lo siguiente proporciona un ejemplo no limitante de cómo uno podría utilizar estas secuencias de ácido

nucleico novedosas para detectar el evento de algodón MON531 en una muestra, incluyendo la, línea de semilla denominada MON15985, y revisar su ausencia en la línea de semilla denominada MON15985X.

Aislamiento del ADN para análisis PCR™.

El ADN proveniente del evento de algodón MON531 se extrajo del tejido de la semilla. El ADN se extrajo tanto de los tejidos de semilla como de hoja provenientes de las sustancias de control (semilla de algodón no transgénica y tejido de hoja). El ADN proveniente de la semilla se aisló al procesar la semilla hasta convertirse en un polvo fino que utiliza un mezclador comercialmente disponible. Aproximadamente 2g de la semilla procesada se transfirió a un tubo cónico de 50n ml, y ~ 16 ml de amortiguador de extracción CTAB [1,5% (P:P)CTAB,75 mM Tris-HCL pH 8.0, 100mM EDTA pH 8,0,1,05 M NaCL y 0,75% (p:p)PVP (MW 40,000] se agregaron a La semilla procesada. Las muestras fueron incubadas a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con una mezcla intermitente y luego se le permitió enfriarse a su temperatura ambiente. Un volumen igual (~16 ml) de alcohol cloroformo: isoamilo (24:1 (v/v)) o cloroformo se agrego a las muestras a

temperatura ambiente. La suspensión se mezclo mediante inversión, y las dos fases se separaron mediante centrifugación a ~16.000 x g durante 5 minutos. La capa acuosa (superior) se removió utilizando una pipeta de transferencia y se ubicó dentro de un tubo cónico limpio de 50 ml. Aproximadamente UN volumen de 1/10 (~16 ml) de un amortiguador CTAB al 10% [10% (p:p) CTAB y o,7 M de NaCL] se agregaron a la fase acuosa, que luego se mezclo mediante inversión. Las muestras se centrifugaron a (~16.000 x g durante 5 minutos para separar las fases. La fase acuosa (superior) se removió, mezclo con un volumen igual (~ 15 ml) del amortiguador de precipitación CTAB [1% (p:p)CTAB, 50 mM Tris pH 8,0 y 10 mM EDTA pH 8,0] y se le permitió permanecer a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Las muestras se centrifugaron a ~ 10.000 x g hasta peletisar el ADN, el supernadante se decanto, y el glóbulo se disolvió en aproximadamente 2 ml de TE de sal alta [10mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 y 1M NaCL] al incubar a 37° C con girado suave durante aproximadamente 2 horas. La centrifugación se desarrollo ~ 23.000 x g hasta peletisar cualquiera de las impurezas remanentes. Se movió el supernadante, se ubicó en un tubo limpio de 15 ml, y aproximadamente 1/10 de volumen (~ 150 µ) de 3 M NaOAc, pH 5,2 y dos volúmenes

(~ 4 ml en relación con el supernadante) de etanol congelado al 100% que fueron agregados para precipitar el ADN. El ADN precipitado se devanó en un tubo micrófugo que contenía aproximadamente 1 ml de 70% de etanol. El ADN se peletizo en un micrófugo a una velocidad máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos se seco, y se redisolvió en TE, pH 8,0 en un refrigerador a 4° C durante toda la noche.

El ADN genómico del algodón no transgénico utilizado como control se aisló del tejido de la hoja que se congeló en nitrógeno líquido y se molió hasta convertirse en un polvo fino utilizando un mortero y un macerados. Aproximadamente un g del tejido de hoja molido se transfirió a un tubo centrífugo de 13 ml y 6 ml de amortiguador de extracción [2,5 ml de amortiguador de extracción de ADN(350 mM de sorbitol, 100 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,38% (P/v) de bisulfito de sodio), 2,5 ml de un amortiguador de lisis de núcleos (200 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCL, 2% (p/v) CTAB), Y 1 ML de sarcosilo (solución al 5% (p/v)] se agregó. Las muestras se incubaron a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con una mezcla intermitente. Se agregaron cuatro y medio milímetros de alcohol y cloroformo: isoamilo (24:1 v/v))

a temperatura ambiente a las muestras. La suspensión se mezclo durante 2 3 minutos, y las dos fases se separaron mediante centrifugación durante 15 minutos a ~ 2.00 x g a 4° C. La capa acuosa (superior) se removió utilizando un a pipeta de transferencia y se ubicó dentro de un tubo centrífugo de 13 ml. Cinco mililitros de isopropanol al 100% se agregaron, y los tubos se mezclaron mediante inversión para precipitar el ADN, el ADN precipitado se devanó en un tubo microfugo que contenía 500 µl de etanol al 70%, el ADN se peletizo en un microfugo a una velocidad máxima de (14.000 rpm) durante 2 minutos. El ADN se secó y se disolvió en un amortiguador TE en un refrigerador a 4° C durante toda la noche.

Verificación del PCR™ de uniones de genoma de inserto de algodón único en el evento de algodón MON531.

Las secuencias de ADN de cuatro uniones de genoma/inserto de algodón se identificaron utilizando el PCRTM basado el "Universal Genome Walker Kit™ de acuerdo con el protocolo del fabricante seguido por secuenciación del nucleótido de los productos PCR™. Luego, los ensayos PCR™ se desarrollaron utilizando un iniciador complementario al ADN genómico del algodón y otro

iniciador complementario al ADN del transgen insertado. Por ejemplo, un iniciador designado en el extremo 3´ del primario, inserto funcional complementario a la secuencia del flanqueo genómico (por ejemplo SEC ID NO:6) pareado con un segundo iniciador en el extremo 3´ del primario, inserto funcional complementario a la secuencia del transgen insertado (por ejemplo SEC ID NO:5). Los ensayos PCR™ se desarrollaron utilizando 10-100 ng de la plantilla de ADN geonómico del evento de algodón MON531 en un volumen de reacción de 50µ que contienen una concentración final de 1.1 mM Mg^{2+}, 0,4 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, y 2,5 unidades de polimerasa de ADN Taq. Las reacciones para los ensayos PCRTM se desarrollaron bajo las siguientes condiciones cíclicas: 1 ciclo a 94° C durante 3 minutos; 38 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72° C durante 90 segundos; 1 ciclo a 72° C durante 10 minutos. Los productos PCR™ se separaron utilizando la técnica electroforesis con gel de agarosa, visualizada mediante manchado con bromuro de etidio sacado el gel, y sometido a secuenciación de ADN utilizando química de tinte terminador para confirmar las secuencias.

En el ejemplo anterior, como se esperaba, las reacciones de control sin el ADN de plantilla y el ADN de color negativo no transgénico coker 312 no generaron un producto PCR™. Las muestras MON531 del evento de algodón generaron el tamaño esperado de los productos PCRTM DE 264 bp para la secuencia de flanqueo 3´. Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico novedosas y la unión del ADN insertado y el ADN geonómico de algodón en el evento de algodón MON531 son útiles para detectar el ADN derivado del evento de algodón MON531 en una muestra.

El MON531 en el trasfondo de la variedad coker 312 se cruzaron con a variedad DP50 (Delta & Pine Land Company) para producir una variedad que contiene el evento MON531 que codifica la proteína Cry1Ab, que se designó como DP50B.

EJEMPLO 2

Este ejemplo describió la producción de una planta de algodón transformada designada como MON15985 derivada del DP50B que contenía un evento de deserción adicional que codifica una proteína inhibitoria de insecto Cry2Ab y

el aislamiento y caracterización de las secuencias del ADN 5´ y 3´ que flanquean los extremos 5´ y 3´ del MON15985.

Las células vegetales DP50B objetivo se transformaron utilizando tecnología de aceleración de partícula con un segmento de ADN lineal derivado del plásmido PV-GHBK11. El segmento de ADN lineal se preparó mediante la digestión del plásmido PV-GHBK11 con la enzima de restricción KpnI, separación de los fragmentos del plásmido mediante electroforesis con gel de agarosa y aislamiento del segmento de ADN que contiene el cartucho que comprende la secuencia de codificación del cry2Ab y la secuencia de codificación del uidA (GUS). Ninguna estructura de plásmido esta contenida dentro del segmento o secuencia aislada y purificada y preparada para el bombardeo del tejido de algodón. El cartucho de expresión consiste de una región de codificación cry2Ab regulada mediante un promotor expresable en planta CaMV 35S mejorado y una terminación de trascripción NOS3´ de Agrobacterium Tumefaciens y la secuencia d epoliadenilación. La secuencia de codificación del cry2Ab se designa para ser blanco de producto de expresión como una proteína precursora para importar cloroplasto en las

células vegetales (según se describe en la WO 0026371 y la solicitud de patente estadounidense serie N0. 09/186,002, presentada en noviembre 4, 19998, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia).

La variedad dl algodón DP50B se transformo con el cartucho de ADN descrito anteriormente mediante el bombardeo con partículas de oro recubiertas con ADN utilizando un método de descarga electrostática (John, M.E., Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17:185-208 (1997).Los deferentes eventos fueron tamizados para la eficacia contra plagas de insectos, fenotipo, y segregación genética para la expresión de la proteína Cry2Ab. Basado en estos criterios, se escogieron 6 líneas para caracterización adicional del evento de inserción. La mancha del sur fue utilizada como el método primario para evaluar la presencia de uno o más números de copias de inserción y complementariedad del evento de inserción. Una línea, 15985, se escogió para caracterización molecular completa del evento de inserción que se insertó en el genoma DP50B. El ADN que circunda el evento de inserción se aisló y se caracterizó.

Aislamiento del ADN que flanquea el evento de inserción: El ADN se extrajo de hojas jóvenes de algodón mediante un método Fito-Pure® modificado de Amersham que se designó para extraer ADN de las plantas con grandes cantidades de carbohidratos contaminantes. Con el fin de determinar la secuencia del ADN alrededor de la secuencia codificante cry2Ab insertada, el protocolo de Genome Walker® de Clone Tech, Inc. Se utilizó. Los fabricantes recomendaban condiciones que eran seguidas con solo una Modificación: en lugar de utilizar extracción con fenol para purificación del ADN después de la división de endonucleasa de restricción, el ADN se purificó con una columna de giro Qiagen QIAquick® d acuerdo con el manual de instrucciones del fabricante.

Las enzimas utilizadas para cortar el ADN geonómico antes de la ligazón del ligador fueron Dral, Pvull, Scal and Stul. Luego del procedimiento suministrado por Qiagen, se extrajo el ADN en 5 volúmenes de amortiguador PB, unido a la columna. Lavado con 0,75 ml de PE y luego eluido de la columna en 20 mL, 10mM Tris pH 8,5. Este ADN se utilizó entonces como fuente de las bibliotecas ligadoras. Las posiciones del iniciador fueron deliberadamente escogidas de los extremos de donde el ADN

fue linealizado para permitirle una cierta cantidad de supresión en su extremo. Los primeros iniciadores (SEC ID NO:30 y SEC ID NO:31) se designó para fortalecer las secuencias que eran únicas a la secuencia codificante cry2Ab en razón de la presencia de los elementos de ADN repetidos en el genoma del algodón. Los productos PCR™ resultantes se sometieron a una segunda reacción PCR™ utilizando iniciadores anidados directamente en forma adyacente a aquellos utilizados en la primera reacción (SEC ID NO:32 y SEC ID NO:33). Los parámetros PCR™ utilizados fueron aquellos recomendados por Clone Tech. Los parámetros de amplificación primaria fueron como sigue:7 ciclos 94° C 2 seg, 72° C 3 min, 32 ciclos 94° c 2 seg, 68° C 3 minutos, y parámetros de amplificación secundaria fueron como sigue: 5 ciclos 94° C 2 seg, 72° C 3 min, 20 ciclos 94° C2 seg, 68° C 3 minutos, y 68° C 4minutos en el último ciclo. Todas las reacciones PCRTM se desarrollaron en una máquina Perkin-Elmer 9700.

Los productos PCRTM resultantes provenientes de la segunda amplificación se clonaron en el vector pBS(SK+)proveniente de Stratagene el cual había sido cortado con SmaI para generar un extremo despuntado y tratar con fosfatasa alcalina para evitar autoligación.

Los fragmentos de ADN que fueron generados en la reacción PCR™ secundaria se trataron con quinaza T4 de ADN para agregar un fosfato 5´ y luego ligarla al vector de extremo despuntado bajo condiciones De ligación estándar.

Protocolo de Genome Walker®: Las reacciones de PCR™ secundarias utilizando los pares iniciadores anidados produjeron múltiples fragmentos sintetizados de ambos extremos 5´ y 3´. Estos fragmentos independientes para el extremo 5´ se clonaron y secuenciaron utilizando métodos bien conocidos en la técnica, mientras que dos fragmentos fueron clonados y secuenciados del extremo 3´. Para cada fragmento individual, al menos se obtuvieron dos clones independientes.

La secuencia de los clones de cada conjunto iniciador se comparó una con la otra. Las secuencias entre los clones respectivos se determinaron como siendo la misma, y conteniendo la misma unión de transgen de planta.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra como las secuencias de ADN de flanqueo del evento de inserción MON15985 se pueden utilizar para determinar sigositidad.

Diseño y desarrollo de un PCR™ basado en ensayos para homocigositidad del evento de inserción MON15985: La secuencia de ADN de las dos regiones de flanqueo del evento de inserción MON15985 se utilizaron para diseñar un ensayo de homocigositidad basado en PCR™. Tal ensayo sería considerado útil si fuera capas de detectar tanto el evento de inserción MON15985 especifico como el cromosoma tipo silvestre. Para ensayar la factibilidad de desarrollar un ensayo que también detecte el cromosoma tipo silvestre, se diseñaron iniciadores provenientes de la secuencia directamente adyacente al evento de inserción para ensayar si ellos pudieran ser utilizados para sintetizar un fragmento de ADN en algodón no transgénico así como también en la línea 15985. Los iniciadores escogidos fueron capaces de sintetizar el evento de inserción MON15985 total pero no se observó ningún producto en los controles no transgénicos. Estos resultados indicaron que el evento de inserción no era una simple ruptura en el ADN y la inserción de la secuencia de SADN del cartucho que codifica la proteína

Cry2Ab. Este resultado, sin embargo establecido que los dos extremos están de hecho conectados y flanquean un cartucho de gen intacto que contiene cry2Ab.

Los cebadores fueron diseñados para la secuencia de ácido nucleico que flanquea el extremo 3´ del inserto para los fragmentos de amplificación por medio del protocolo Genome Walker® en librerías de enlaces hechos a partir de ADN de algodón no transgénico. Un fragmento de par de bases 620 fue clonado y secuenciado a partir de un algodón no transgénico. Esta secuencia fue entonces usada para diseñar los cebadores para el tipo silvestre de cromosoma que estaría presente en el individuo en el heterozigotodo. Varios conjuntos de cebadores fueron hechos y ensayados juntos para poder encontrar un conjunto que trabajara en una reacción única y siempre que no existieran bandas de antecedentes. Un conjunto de cebador que comprende la secuencia la SEC ID NO:34 (secuencia que flanquea la planta de algodón 3´) y SEC ID NO:35 (secuencia que flanquea la planta de algodón 5´) fue encontrada que producía un amplicon de par de base 800 a partir de un tipo silvestre, o un ADN de algodón no transgénico. Sin embargo, si por lo menos un inserto, está presente el cebador comprende la SEC ID NO:36 la

cual anillará en cry2Ab en las secuencias específicas de cry2Ab y genera un amplicon de 1,5 kb con un anillado de cebador en la secuencia de flanqueo de planta de algodón 3´(SEC ID NO:34). Por lo tanto, el ensayo resultante usando cebadores PCR™ comprende SEC ID NO:36,SEC ID NO:34, y SEC ID NO:35 como sigue: si un individuo es homocigoto para la inserción MON15985 en el evento entonces solamente una banda de 1,5 kb estaría presente; pero si es heterocigoto entonces una banda adicional de 0,8kb estaría también presente.

Juntas de estas bandas (1,5kb y 0,8 kb) fueron clonadas y secuenciadas para confirmar su identidad. La secuencia del ADN del fragmento de par base 800 generada en los individuos heterocigotodos es idéntica a la secuencia del fragmento Genome Walker® generado por los cebadores tomados del extremo 3´ y del ADN no trasgénico.

Confirmación del PCR™ con ensayo de zigocidad: para verificar la precisión del ensayo de zigocidad una serie de experimentos fueron conducidos utilizando progenia transgénica homozigotoda, heterozigotoda y negativa del MON 15985.

R2:

Fenotipo: 15 plantas R2 individuales a partir de 3 genotipos R1 sospechosos fueron caracterizadas en cuanto a la presencia o ausencia de la proteína cry2Ab por medio de ELISA. Las plantas de interés que fueron positivas para el estudio incluyeron MON15985-2 y MON15985-34. La planta MON15985-71 fue identificada como negativa para la proteína cry2Ab.

R3:

Fenotipo:15 semillas R3 individuales de cada una delas plantas R2 seleccionadas fueron plantadas en tarros de 4" y subsecuentemente tamizadas en cuanto a la presencia de la proteína cry2Ab a través del cualitativo de ELISA. Los resultados ELISA reportados para todas las plantas R3 de MON15985-2 fueron positivas, así dando a los padres R2 una designación de ser homozigotodos para el gen cry2Ab. La progenia R3 de MON15985-34 fueron una mezcla de plantas positivas y negativas dando a la pariente R2 una designación de ser heterozigotoda para el gen cry2Ab. Todas las plantas R3 de MON15985-71 fueron negativas y confirmaron que la pariente R2 fue negativa también.

Genotipo: El ensayo de zigocidad con base en APCRTM fue llevado a cabo en cinco plantas R3 MON15985-2 y MON15985-71. Los cebadores y técnicas fueron utilizados como se describió previamente. Los resultados de este ensayo dio los patrones de bandas esperadas. Toda la progenie de MON15985-2 produjo solamente la banda única de 1,5 kb soportando los datos Elisa que, indicaron que la línea MON15985-2 es positiva homozigotoda para el gen cry2Ab. Toda la progenia de MON15985-71 produjo solamente la banda única de 0,8 kb encontrada en el tipo silvestre, soportando así los resultados Elisa al demostrar que esta línea es homozigotoda negativa para el gen cry2Ab. Cinco progenies de cada una de los catorce familias individuales R2 de MON15985-34 fueron tamizadas lo mismo que dando combinaciones de plantas homozigotodas, heterozigotodas y negativas.

R4:

Cinco plantas individuales de todas las tres poblaciones R3 se les permitió auto polinizarse y fueron cosechadas. Quince progenies R4 de cada una de las plantas R3 ensayadas por medio de PCR™ fueron plantadas

113 T9 T14

en tarros de 4" para confirmar los resultados sobre las plantas R3. Así, si los resultados en R3 PCR™ fueron homozigotodos entonces todas las progenies R4 deberían ser homozigotodas, lo mismo que si los resultados en R3 por medio de PCRTM eran heterozigotodos la progenie R4 debería ser una mezcla de plantas homozigotodas, heterozigotodas y negativas. Todas Las familias de progenie R4 suministraron los resultados esperados con base en el ensayo PCRTM en R3. Por lo tanto, los ensayos con base en PCR™ suministran un método durable para genotipiar plantas en cuanto a zigocidad.

EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra las secuencias de ADN flanqueadas en los extremos 5´ y 3´ del inserto en un evento de algodón MON15985.

El ADN de MON15985 fue extraído de tejido de hojas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas hasta un polvo fino usando un mortero y un martinete. Aproximadamente 1 g del tejido de hojas molido fue transferido a un tubo centrífugo de 13 ml y una carga de extracción de 6 ml [2,5 ml de carga de extracción de

ADN(350 mM de sorbitol, 100 mM de Tris pH 7,5 mM EDTA 0,38% (P/v)de bisulfito de sodio), 2,5 ml de carga de lisis de núcleo (200mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCL, 2% (p/v) CTAB), y un ml de sarcosil [5% (p/v) en solución)]las muestras fueron incubadas a 65° C durante aproximadamente 35 minutos. Cuatro y medio mililitros de cloroformo: alcohol isoamilo [24:1 (v/v)] a temperatura de cuarto fueron agregados a las muestras. La suspensión fue mezclada durante 2 o 3 minutos, y las dos fases fueron separadas por centrifugación durante 15 minutos a ~ 2000 x g a 4° C. La capa acuosa (superior) fue removida y colocada en un tubo centrifico de 13 ml. Cinco mililitros de 100% de isopropanol fueron agregados, y los tubos fueron mezclados por inversión para precipitar el ADN. El ADN precipitado fue bobinado en un tubo de micro fuga que contenía 500 µl de 70% de etanol. El ADN fue convertido en pepitas en un micro fuga a una velocidad máxima (14000 rpm) durante 2 minutos. El ADN fue secado y disuelto en carga de TE en una refrigeradora 4° C durante la noche.

El ADN tomado del control DP50 fue extraído a partir del tejido de semilla. El ADN de la semilla fue aislado por medio de procesar la semilla hasta convertirla en

115
116

polvo fino usando un mezclador disponible comercial. Aproximadamente 2 g de la semilla procesada fue transferido a un tubo cónico de 50 ml, y ~ 16 ml de carga de extracción de CTAB [1,5% (p/v)CTAB, de 75 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 1.05 M de NaCL. Y 0,75% (p/v) PVP(MV 40000)] fueron agregados a la semilla procesada. Las muestras fueron encubadas a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con mezclado intermitente y luego se les permitió enfriarse a temperatura de ambiente. Un volumen igual de(~ 15 ml) de cloroformo a temperatura ambiente: alcohol isoamilo [24:1(p/v)] fueron agregados a las muestras. La suspensión fue mezclada durante cinco minutos, y las dos fases fueron separadas por centrifugación a ~16000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La capa acuosa 8superior) fue removida y colocada en un tubo cónico de 50 ml limpio. Aproximadamente 1 /10 en volumen (~1,5 ml) de carga de CTAB al [10%(p/v)CTAB Y 0,7 M NaCL] y un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamilo [24:1 (v/v)] fueron agregados a la fase acuosa, l cual fue entonces mezclada por inversión durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a ~16000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. La fase acuosa (superior) fue removida, mezclada, con un volumen

igual (~15 ml) de carga de precipitación CTAB [1% (p/v)] CTAB, 50mM Tris pH 8,0 y 10 mM EDTA pH 8,0] y se les permitió permanecer a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Las muestras fueron centrifugadas a ~10000 x g hasta volverlas pepitas del ADN, el sobre nadante fue decantado, y las pepitas fueron disueltas en aproximadamente 2 ml de TE de alta sal[10 mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 y 1 M NaCL] por medio de incubar a 37° C con un batido suave durante aproximadamente 2 horas o por medio de asentarlo en un refrigerador a 4° C durante la noche. La centrifugación fue llevada a cabo ~ 23000 x g para peletizar cualquier impureza remanente. El sobre nadante fue removido, colocado en un tubo de 15 ml limpio, y aproximadamente 1/10 en volumen (~150 µl) de 3M NaOAc, pH 5,2, Y 2 volúmenes (~4 ml relativo al sobre nadante) de 100% de etanol fueron agregados al precipitado de ADN. El precipitado de ADN fue bobinado dentro de un tubo micro fuga que contenía aproximadamente 1 ml de 70% de etanol. El ADN fue peletizado en un micro fuga a velocidad máxima (14000 rpm) durante 5 minutos secado, y redisuelto en TE, pH, 0 en un refrigerador a 4° C durante la noche.

El ADN de cada uno DP50 y MON15985 fue cuantificado antes de la iniciación del estudio dentro del estudio para el cual ellos fueron derivados. La cuantificación del ADN fue conducida usando un Fluorometro Hoefer DyNA Quant 200 usando un marcador de tamaño molecular IX de Boehringer Mannheim como un estándar de calibración de ADN.

El análisis PCR de la secuencia genómica de flanqueo del extremo 5´ del inserto que codifica la proteína cry2Ab en el evento de algodón MON15985 fue llevada a cabo usando un cebador derivado de la secuencia de flanqueo genómico de 5´ apareada con un segundo cebador localizado en el inserto de ADN cercano al extremo 5´ en la secuencia de promotor CaMV 35S mejorada, abarcando una región de 1894 (SEC ID NO:26 Y SEC ID NO:27. El análisis PCR para la secuencia genómica que flanquea el extremo 3´ del inserto que codifica la proteína cry2Ab en el evento de algodón MON 15985 se condujo utilizando un iniciador localizado en la secuencia de poliadenilación NOS 3' cerca al extremo 3´ del inserto pareado con un segundo iniciador derivado de la frecuencia de flanqueo genómico 3´, que abarca una región de 763 bp (SEC ID NO:28 Y SEC ID NO:29).

Los análisis PCR fueron conducidos usando ADN genómico del evento de algodón MON15985 o de la línea de algodón transgénica DP50. El análisis PCR fue conducido usando 35 a 50 ng del evento de algodón MON15985 o la línea no transgénica DP50 de la plantilla ADN genómica en una reacción en volumen de 50 µl que contenía una concentración final de 1,5 mM Mg^{2+}, 0,2 µM de cada cebador, 200 µM de cada Dntp, Y ,5 unidades de platino de polimeraza de ADN Taq (Gibco BRL). Las reacciones para el extremo 5´ del inserto fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado:1 ciclo a 94° C a durante 3 minutos ; 35 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Las reacciones para el extremo 3´ del inserto fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto, 72°C durante 45 segundos; 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,0%. La electroforesis fue conducida durante aproximadamente 1,5 a 2 horas a 100 V y visualizado por el estañado de bromuro de etidio.

119
420

Los productos PCR de los tamaños esperados que contenían las secuencias de flanqueado de los extremos 5´ y 3´ del inserto que codifica la proteína Cry2Ab en el evento de algodón MON15985 generado con dos pares de cebadores fueron aislados por electroforesis de gel de 20 µl de los productos PCR sobre geles de agarosa al 1,0%. Los productos de PCR que representan las secuencias de flanqueado 5´ o 3´ fueron cortadas a partir de un gel y purificadas usando un kit QIAquick Gel Extracción (Qiagen)seguido por el procedimiento suministrado por el fabricante. Para ambos análisis, los productos PCR purificados fueron entonces secuenciados con cebadores PCR usando la química de tintura determinación. Debido a la longitud de los productos PCR, el secuenciado fue llevado a cabo tanto con los cebadores usados para generar los productos lo mismo que cebadores diseñados internamente a la secuencia amplificada.

Los análisis PCR fueron llevados a cabo sobre ADN genómico extraído del evento de algodón MON15985 y la línea de algodón no trasgénico DP50 para verificar las secuencia de flanqueado de ADN de los extremos 5´ y 3´ del inserto en el evento de algodón MON15985. La reacción de control no contenía ninguna plantilla de ADN lo mismo

que la reacción contenía un ADN de algodón no transgénico DP50 que no genero un producto PCR como se esperaba. El análisis PCR del evento de algodón MON15985 en el ADN generó el producto de tamaño esperado de 1984 bp representando la secuencia de flanqueo 5´ y una porción del extremo 5´ en el inserto que codifica la proteína Cry2Ab.

La reacción de control no contenía una plantilla de ADN lo mismo que la reacción que contenía el ADN de algodón no transgénico DP50 que no generó un producto PCR como se esperaba. El análisis PCR del evento de algodón MON15985 ADN generó el producto de tamaño esperado de 763 bp representando la secuencia de flanqueo 3´ y una porción del extremo 3´ del inserto. Estos resultados demostraron que un tamaño predicho del producto PCR es generado desde ambos extremos del inserto que codifica el Cry2Ab en el evento de algodón MON15985.

La secuencia de consenso representando la secuencia de ADN genómica de algodón que flanquea el extremo 5´ del inserto, lo mismo que el ADN en el extremo 5´ del inserto, esta representada por la sec id no:11. Los datos de secuencia de consenso del 5´ contienen 1877 bp de ADN

121
122

que flanquea el inserto seguido por 390 bp de la secuencia del inserto que contienen el promotor CaMV 35S mejorado. Pares de base 362-750 muestran homología en el ADN de cloroplasto. La secuencia de consenso que representa la secuencia genómica de algodón que flanquea el extremo 3´ del inserto, lo mismo que el ADN en el extremo 3´ del inserto, se representa por la SEC ID NO:12. Los datos de secuencia de consenso 3´ contienen 349 bp de la secuencia de inserto que contiene el extremo 3´ del NOS de la secuencia de poliadenilación 3´ y la secuencia de polienlazador seguida por 1012 bp de ADN de algodón genómico que flanquea el inserto. Las secuencias de consenso reportadas 5´ y 3´´ presentadas aquí son la combinación de reacciones de secuenciado múltiple y son más cortas que aquellas de los productos PCR usados para generar las secuencias. Estos datos delinean los extremos 5´ y 3´ del inserto en el evento de algodón MON15985 y muestran el ADN que inmediatamente flanquea el inserto en ambos extremos.

Estos datos demuestran que el evento de algodón MON15985 contiene un inserto de ADN único que contiene (1) una secuencia que codifica UidA (GUS) regulada por el promotor 35S CaMV mejorado (carente aproximadamente de

260 bp en el extremo 5´) y la secuencia NOS 3´ de poliadenilación; y (2) una secuencia de codificación que codifica el Cry2Ab regulado por el promotor 35S CaMV mejorado y la secuencia de poliadenilación NOS 3´ (figura 1). El PCR y los análisis de secuencia llevados a cabo en este ejemplo confirman que la secuencia de los extremos 5´ y 3´ del inserto que codifica el Cry2Ab en el evento de algodón MON15985, y que verifica la secuencia del ADN genómica que flanquea los extremos 5´ y 3´ del inserto.

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra las características físicas de las secuencias que flanquean el evento de algodón MON15895, y caracteriza la naturaleza y la localización física de las secuencias adicionales del ADN que flanquean los extremos 5´ y 3´ del ADN insertado en el evento de algodón MON15985. El ADN genómico fue analizado por medio del secado Southern para determinar el número de eventos de inserción, el número de copias del ADN insertado, la integridad de los promotores insertados, las regiones de codificación, y las secuencias de poliadenilación, y la presencia o ausencia de secuencias de estructuras de plasmidos. Todos los análisis fueron

llevados a cabo tanto con la línea de algodón DP50B (control) y con el evento producido MON15985 novedoso para caracterizar el ADN insertado novedoso. En adición, la secuencia de flanqueo del extremo 5´ y del 3´ "insert- a plant uniones" inserto a plantas" (previamente determinadas por el Genome Walking) fueron confirmadas por el PCR.

El plásmido PV-GHBK11, el plásmido de fuente, sirvió como la sustancia de referencia principal en estos análisis. El plásmido, mezclado con ADN de la sustancia de control DP50 fue usado como un indicador de tamaño y un control de hibridización positivo en el análisis de secado Southern. Adicionalmente, los marcadores de tamaño molecular de Boehringer Mannheim [Molecular Weight Markers II(23,1 Kb -0,6Kb) y IX (1,4 Kb-0,072 kb), catalogo # 236 250 y # 1449 460, respectivamente] y Gibco BRL [High Molecular Weight DNA Marker (48,5 Kb-8,3 Kb) y de escalera de 100 bp (2,1 Kb-0,1Kb), catalogo # 15618-010 y # 15628-019, respectivamente] fueron usados para las estimaciones de tamaño.

El ADN genómico del evento de algodón MON15985 protegido contra insectos fue digerido con una variedad

de enzimas de restricción y sometido a un análisis de hibridización de secado Southern para caracterizar la codificación ADN del Cry2Ab y el GUS integrado dentro del genoma del DP50B.

El ADN extraído del tejido de hoja fue utilizado para todos los análisis de este ejemplo excepto para aquellas muestras no transgénicas sobre la totalidad del cartucho de gen iudA en el ensayo de secado probado con la prueba de secuencia de poliadenilación NOS 3´ que fue aislado de acuerdo con el método de Rogers y Bendich (1985). El tejido de hoja fue congelado en nitrógeno líquido y molido en polvo fino usando un mortero y un martinete. Aproximadamente 1 g del tejido de hoja molido fue transferido a un tubo centrífugo de 13 ml que contenía 6 ml de la carga de extracción [2,5 ml de carga de extracción ADN (350 mM de Sorbitol, 100mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA), 2,5 ml de carga de lisis de núcleo (200 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCL, 2% CTAB), y 1 ml de sarcosil (soluciónal5%)]. Las muestras fueron incubadas a 65°C durante aproximadamente 30 minutos con mezclado intermitente. Cuatro y medio milímetros de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamilo (24:1) a temperatura ambiente fueron agregadas a las muestras. La suspensión

125
126

fue mezclada durante 2 a 3 minutos, y las dos fases separadas por centrifugación durante 15 minutos a ~ 100 x g a 4°C. La capa acuosa (superior) fue removida usando una pipeta de transferencia y colocada dentro de un tubo centrífugo de 13 ml. Cinco mililitros de 100% de isopropanol fueron agregados, y los tubos fueron mezclados por inversión para precipitar el ADN. El precipitado de ADN fue peletiado por centrifugación a ~1000 x g durante 5 minutos a 4°C. Las pepitas fueron lavadas con aproximadamente 1 ml de etanol al 70% y centrifugadas durante 5 minutos adicionales a más o menos 100 x g a 4°C. Al ADN se le permitió cercarse a ~~temperatur~~a ambiente y fue redisuelto en TE a 4°C durante la noche.

El ADN genómico purificado fue cuantificado usando un Fluorómetro Hoefer DyNA Quant™ 200 (San Francisco, CA) con un marcador IX de peso molecular Weight Marker usado como estándar de calibración.

Aproximadamente 10µ de ADN genómico para el ensayo y las líneas de control fueron usados para digerir la enzima de restricción. Durante la noche la digestión fue llevada a cabo a 37°C de acuerdo con los fabricantes de

126
127

protocolo según volumen total de 500 µl usando 100 unidades de enzima de restricción. Algo de la digestión de control fue anulados con 5 o 10 pg de PV-GHBK11. Todas las enzimas de restricción fueron compradas de Boehringer Mannheim. Después de la digestión las muestras fueron precipitadas agregando un volumen de 1/10 (~50 µl de NaOAc a 3M Y 2 volúmenes(~1 ml en relación con el volumen de digestión original) de etanol al 100%, seguido por incubación a menos 20°C durante por lo menos una hora. El ADN digerido fue pelletiado por centrifugación, lavado con etanol al 70%, secado al vacío durante 10 a 20 minutos, y redisuelto a temperatura ambiente sea en agua o en TE.

Los ADN digeridos fueron separados sobre 0,8% de geles de agarosa en una carga de TBE 1X. Una gran corrida y una corrida corta fueron llevadas a cabo para cada análisis de secado Southern. La corrida larga facilita mayormente la resolución de un ADN de peso molecular alto mientras que la corrida corta asegura que todos los ADN de peso molecular pequeño fueran retenidos sobre el gel. Las corridas tanto larga como corta involucraron una electroforesis de 4 a 6 horas a entre con 80-85 V y una corrida durante la noche (9 a 15 horas) a 35 38 v.

127
128

Después de la electroforesis, los geles fueron lavados con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 a 30 minutos y fotografiados.

El ADN del plásmido PV-GHBK11 fue aislado durante la noche con cultivos de E. coli. Las plantillas de prueba homólogas a la región de codificación cry2AB, región de codificación uidA, el promotor CaMV 35S mejorado, la secuencia de poliadenilización NOS 3´ y la región completa de estructura fueron preparadas por PCR usando el PV-GHBK11 como plantilla.

Aproximadamente 25 ng de cada plantilla de prueba, excepto de la de secuencia de poliadenilización NOS 3´, fueron marcadas con ^{32}p-dCTP usando un método de cebador aleatorio (RadPrime ADN Labeling System, Life Technologies). La secuencia de poliadenilización NOS 3´ fue marcada usando PCR con una plantilla NOS 3´ (15 ng), los cebadores específicos NOS 3´ (0,25 µM), 1,5,mM $MgCL_2$ 3 µM dATP, dGTP, y dTTP, 100 µCi de ^{32}P-dCTP y 2,5 unidades de polimeraza de ADN Taq en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 5 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1

minuto;1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. La probeta radio marcada fue purificada usando una columna de Sefadex G-50 (Boehringer Mannheim).

Los análisis de secado Southern (Southern, 1975) fueron llevados a cabo estableciendo procedimientos, generalmente Maniatis Fritsch Sambrook (Cold Spring Harbor). Seguido de la electroforesis, el gel fue incubado en una solución de depurinización (o,125 N HCL) durante ~10 minutos seguido por una solución desnaturalizante 8°,5 M NaOH, 1,5 M NaCL) durante aproximadamente 30 minutos, y luego una solución neutralizante (0,5 M Tris-HCL pH 7,1,5 M NaCL) durante aproximadamente 30 minutos. El ADN de los genes de agarrosa fue transferido a membranas de nailon Hybond-N™ (Amersham) usando un Turboblotter™ (Schleicher & Schuell). El ADN se le permitió transferirse durante 4 horas durante la noche (en 20X SSC) y reticulado covalentemente con la membrana con un UV Stratalinker™ 1800(Stratagene) posesionado par autoreticulación. Los secados fueron prehibridizados en un promedio de 2 horas en Una solución acuosa de 0,5 M de fosfato de sodio 7% SDS (p/v), y 0,1 mg/ml DE tRNA de E. Coli. La hibridización con la probeta de radio marcada fue llevada

130 179

a cabo en una solución fresca de pre hibridización durante 14 a 21 horas aproximadamente 65°C. Las membranas fueron lavadas aproximadamente 4 veces en una solución acuosa de 0,1! (p/v) SDS y 0,IX SSC durante intervalos de 15 minutos a 65°C. Las exposiciones múltiples de los secados fueron generados usando Kodak Biomax MS™ film en conjunto con una pantalla de intensificación Kodak Biomax MS™ . Los secados fueron cortados por medio de incubar el secado con una SDS al 0,1% (p/v) hirviendo y permitiéndosele enfriar a temperatura ambiente.

El número de inserto(el número de sitios de integración del ADN transgénico introducido novedosamente en un genoma de algodón) fue evaluado. El ensayo y el ADN de control fueron digeridos con la enzima de restricción ScaI, la cual no fractura dentro del segmento de ADN usado para la transformación. Esta enzima liberó un segmento que contenía el ADN insertado y adyacente al ADN genómico de la planta. Las muestras de la corrida corta del plásmido DP50 fueron también digeridas coN XbaI para linearizar el plásmido. El secado fue probado con la referencia plásmido PV-GHBK11.

130
131

El número de copias del cartucho de transformación insertado dentro de cada locus fue determinado por la digestión del ADN genómico de ensayo con la enzima de restricción SphI, una enzima que corta solo una vez en el segmento del ADN lineal usado para generar el evento. El secado fue probado con el plásmido de referencia PV-GHBK11.

La integridad de la región de codificación cry2Ab fue determinada por la digestión con una enzima de restricción, NcoI, que fractura en los extremos 5´ y 3´ de la región de codificación cry2Ab. El secado fue probado con la longitud completa de la región de codificación cry2Ab.

La integridad del cartucho de codificación cry2Ab (el promotor CaMV 35S mejorado, la región de codificación cry2Ab, y la secuencia de poliadenilización NOS 3´) fue accesada por digestión con la enzima de restricción BamHI que fractura en los extremos 5´ y 3´ de los cartuchos cry2Ab. El secado fue probado secuencialmente con cada elemento del cartucho.

La secuencia e las uniones ADN genómica inserto a planta 5´ y 3´ fueron determinadas como se describió anteriormente usando el kit Clontech´s Universal Genome Walker™ . Los cebadores fueron diseñados para verificar estas uniones por PCR. La unión 5´ fue verificada usando un cebador diseñado para la secuencia de flanqueo genómico 5´ apareada con un segundo cebador en el promotor CaMV 35S mejorado del gen uidA. La unión 3´ fue verificada usando un cebador diseñado par la frecuencia del flanqueo genómica de 3´ con un segundo cebador localizado en el gen cry2Ab.Los PCR fueron conducidos usando 100 ng de ADN genómico de hoja (1 a 2 µl) como una plantilla, 10 pmol de cada cebador 81 µl cada uno), y PCR Supermix (Gibco BRL cat n0. 10572-014) en un volumen de reacción de 25 µl. La amplificación de las reacciones fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; 1 ciclo de 72°C durante 4 minutos. Los productos PCR fueron separados sobre un gel de agarosa al 1% en TAE al 1X y visualizados por manchado con bromuro de etidio.

La integridad de la región de codificación uidA fue determinada por la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BglII que fractura en los extremos 5´ y 3´ de la región de codificación uidA, respectivamente. El secado fue probado con la longitud completa de la región de codificación uidA.

La integridad del cartucho uidA (promotor CaMV 35S mejorado, región de codificación uidA, y secuencia de poliadenilización NOS 3´) fue accesada por digestión con las enzimas de restricción de BamHI, y SphI que fracturan en los extremos 5´ y 3´ con el cartucho uidA. El secado fue probado secuencialmente con cada elemento del cartucho.

La región de estructura principal del plásmido esta definida como el fragmento de restricción KpnI de PV-GHBK11 que no fue usado para transformar la planta. Este consiste de un origen bacterial de replicación, ori-pUC, y el gen nptII bajo el control de un promotor bacterial. Para confirmar la ausencia de la estructura principal, el ADN genómico fue digerido con la enzima de restricción KpnI y probado con la longitud completa de la región de estructura principal.

Las muestras de ensayo y de ADN de control fueron digeridas con ScaI. El ADN de control DP50 partió con PV-GHBK11 que también fue digerido con ScaI. Ya que el ScaI no fractura dentro del plásmido, una segunda enzima, XbaI fue agregada para linearizar el plásmido. El plásmido fue linearizado para facilitar la migración a través del gel para servir como un estimador de tamaño preciso. El secado fue probado con PV-GHBK11 radiomarcado(figura 1), la fuente de plásmido para el segmento de ADN lineal usado en la transformación. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda de base detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo la banda de tamaño esperado en aproximadamente 8,7 KB, el tamaño del plásmido completo sin ninguna banda adicional. Las corridas larga y corta de DP50B produjeron dos bandas aproximadamente 22 Kb y 15 Kb (muy desvanecidas). Ya que estas bandas están presentes en ambos eventos MON15985 Y EL DP50B (MON531) de control ellos están considerados como bandas de fondo o de antecedente asociados con el evento MON531. Los MON15985 largo y corto cada uno producido sobre una banda no presente en ninguno de las pistas DP50 O DP50B en aproximadamente 9,3 Kb. Estos resultados sugieren que el evento MON15985 del algodón

contiene un segmento de ADN integrado localizado sobre un fragmento de restricción ScaI y 9,3 Kb.

El ADN genómico aislado del MON15985, DP50B, DP50 (control no transgénico) Y dp50 mezclado con un plásmido PV-GHBK11, ADN fueron digeridos con SphI. El secado fue probado con PV-GHBK11,el plásmido fuente para el segmento de ADN lineal usado en esta transformación. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda antecedente detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo las bandas de tamaño esperado en 3,9 y 4,8 Kb; una banda diluida adicional en 8,7 Kb en la pista 5 es presumiblemente debida al ADN de plásmido no digerido. Las corridas larga y corta del DP50B produjeron tres bandas en aproximadamente 6,4, 8,3, y 8,6 Kb. Ya que estas bandas están presentes en ambos eventos MON15985 y el DP50B de control ellos son considerados como bandas antecedentes asociados con el evento MON531. Las corridas larga y corta de MON15985 cada una produjo dos bandas no presentes en las pistas DP50 O DP50B en aproximadamente 2,3 Kb y 3,5 Kb. Debido a que la enzima SphI corta solamente una vez dentro del cartucho de transformación, el resultado sugiere que el MON15985 contiene una copia

del ADN integrado que produce estos dos fragmentos de restricción.

El ADN del ensayo, controles y control mezclado con el plásmido PV-GHBK11 ADN fue digerido con NcoI para liberar la región de codificación cry2Ab y accesar el estar intacta. El secado fue probado con una región de codificación cry2Ab de longitud completa. Como se espero, la corrida larga de control no transgénico DP50 y las corridas larga y corta de control DP50B no detectables no mostraron ninguna banda de hibridización detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo la banda esperada en aproximadamente 1,9 Kb que corresponde a la región de codificación cry2Ab completa. Tanto las corridas larga y corta del MON15985 también produjeron una banda de 1,9 Kb que corresponde al tamaño esperado de una región de codificación cry2Ab intacta. Este resultado establece que el evento MON15985 contiene la región de codificación CRY2Ab intacta sin ningún fragmento detectable adicional.

El ADN de los ensayos, y control mezclado con plásmido y con ADN de plásmido PV-GHBK11 fue digerido con BamHI el cual liberó la codificación de cartucho completa

137 132 136

Cry2Ab (por ejemplo la región de codificación cry2Ab, el promotor CaMV 35S mejorado, y la secuencia de poliadenilización NOS 3´).

El secado fue probado con la región de codificación cry2Ab de longitud completa. La corrida larga de control no transgénico DP50 y la corrida larga y corta del DP50B no usaron ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con el DP 50 en la corrida corta produjo la banda esperada de 3,2 Kb que corresponde a la codificación Cry2Ab completa del cartucho. Tanto las corridas corta y larga del MON15985 produjo una banda en aproximadamente 4,0 Kb. Este resultado indica que el extremo 3´ del cartucho de transformación perdió el sitio de restricción BmHI en el genoma de algodón. La secuencia 3´ de la unión inserto a planta, previamente determinada por el genoma caminante, fue verificada por el análisis PCR. 66 pares de base el extremo 3´ del cartucho de transformación fueron mostrados como que habían sido eliminados, incluyendo el sitio BamHI. Los nucleótidos eliminados no incluyen ninguno de la secuencia de poliadenilización NOS 3´ asociada con el cartucho de codificación Cry2Ab, pero solamente con el ADN de enlace. Estos resultados establecen que el cartucho de

codificación Cry2Ab está intacto. No hay cartuchos parciales derivados de esa codificación Cry2Ab que fueran detectados.

El secado usado anteriormente fue cortado y reprobado con el promotor CaMV 35S mejorado de longitud completa. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda antiantescedente detectable. E plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo las bandas de tamaño esperadas en 5,5 y 3,2 Kb con ninguna banda adicional detectable. La corrida larga y corta de DP50B produjeron cinco bandas en aproximadamente 4,4, 5,3, 7,5, 9,4, y 22Kb. Ya que estas bandas están presentes tanto en el evento MON15985 y en el de control DP50B son consideradas como bandas antecedentes asociadas con el evento MON531. Los ensayos largos y cortos del MPN15985 ambos produjeron una banda en aproximadamente 4,0 Kb que no estaba presente ni en el DP50 ni en la pista DP50B. Esto corresponde al fragmento predicho para el cartucho de codificación Cry2Ab dado el resultado obtenido con la probeta de región de codificación cry2Ab. Una segunda banda en las pistas de MON15985 resultaron d ela hibridización al promotor CaMV 35S mejorado asociado con el cartucho de codificación UidA (GUS) que estaba

138
13931
154

predicho pero no aparente en las pistas de prueba. Los resultados de la prueba de secuencia de poliadenilización Nos 3´, discutida mas abajo demuestra que el promotor CaMV 35S mejorado o la secuencia de este promotor asociada con el cartucho de codificación UidA esta presente, pero la manga 4,4 Kb co migra con una banda de antecedente 4,4 Kb y no es aparente. Ningún promotor extraño fue detectado.

El secado usado anteriormente fue recortado y reprobado con la secuencia de poliadenilización NOS 3´ de longitud completa. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda trasfondo detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperadas en 5,5 y 3,2 Kb sin ninguna banda adicional detectable. La corrida larga y corta DP50B produjo una banda en aproximadamente 1,2 Kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento MON15985 como en el DP50B de control es considerado como un antecedente asociado con el evento MON531. Los ensayos las corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas que no estaban presentes en el DP50 o en las pistas DP50B o en aproximadamente 4,0 y 4,4 Kb. La banda 4,0 Kb corresponde al fragmento predicho para el cartucho de

140 +35 139

corta DP50 produjo la banda esperada de aproximadamente 1,9 Kb que corresponde a la región de codificación completa uidA. Tanto la corrida larga como corta del evento MON15985 ADN también produjo una banda de 1,9 Kb que corresponde al tamaño esperado de una región de codificación uidA intacta. Este resultado establece que el evento MON15985 contiene la región de codificación uidA intacta, sin ningún fragmento adicional detectado.

El ADN de la sustancias de ensayo y control fue digerido con BamHI y SphI para liberar el cartucho uidA completo (por ejemplo la región de codificación uidA, el promotor CaMV 35S mejorado, y la secuencia de poliadenilización NOS 3´). El plásmido PV-GHBK11 fue digerido con PstI y corrido en muestras de corrida corta DP50 después de la digestión (excepto para el secado de prueba de secuencia de poliadenilización NOS 3´ el cual el plásmido fue digerido con BamHI y SphI). Esto fue hecho para mostrar el tamaño de un cartucho uidA de longitud completa e intacta.

El secado fue probado con la región de codificación uidA de longitud completa. Como se esperaba, la corrida larga de control no transgénico DP50 y las corridas larga

141 ~~136~~ 140

y corta DP50B de control no mostraron ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo la banda esperada de 2,8 Kb que corresponde al cartucho uidA completo. Tanto las corridas larga y corta del MON15985 produjo una banda de aproximadamente 2,5 Kb. Este resultado indica que una porción del cartucho uidA no estaba presente. La unión inserto a planta 5´ previamente determinada por el génoma caminante, fue verificada por análisis PCR. Esto había demostrado previamente que 284 bp de la porción 5´ del cartucho de transformación fueron eliminados. Estos resultados establecen que el cartucho uidA le falta aproximadamente 260 bp de la secuencia de promotor 5´ y 24 bp del ADN polienlazado derivado para el sitio de clonación múltiple del plásmido. Odell et al. (1985) mostró que tal determinación no debe afectar la iniciación de trascripción precisa. Ningún cartucho adicional parcial uidA fue detectado con la probeta de región de codificación uidA.

El secado usado anteriormente fue cortado y reprobado con el promotor CaMV 35S mejorado De longitud completa. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda de antecedentes. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la

corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperado en 1,5 y 2,8 Kb sin ninguna banda adicional detectada. Las corridas larga y corta DP50B produjeron 5 bandas en aproximadamente 4,3, 4,6, 5,0, 6,6, y 8,5 Kb. Ya que estas bandas están presentes tanto en el evento MON15985 y en el control DP50B son consideradas como bandas antecedentes asociadas con el evento MON531. los ensayos o corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas de aproximadamente 2,5 Y 1,0 Kb no presentes en las pistas DP50 o DP50B. La banda 2,5 Kb corresponde al fragmento pre dicho para el cartucho uidA. La banda de 1,0 Kb resulta del promotor CaMV 35S mejorado asociado con el cartucho de codificación Cry2Ab. Ningún promotoir extraño fue detectado.

El secado fue probado con la secuencia de poliadenilización NOS 3´ de longitud completa. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda de antecedente detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperadas en 3,8 y 2,2 Kb sin ninguna banda adicional detectada. En las corridas larga y corta del DP50B produjeron una banda en aproximadamente 1,2 kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento 15985 y en el

143 142

de control DP50B se considera como antecedente asociado con el evento MON531. Las corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas no presentes en las pistas DP50 o DP50B en aproximadamente 2,5 y 2,3 Kb. La banda 2,5 Kb corresponde al fragmento predicho para el cartucho uidA. La banda de 2,3 Kb resulta de la secuencia de poliadenilización NOS 3´ asociada con el cartucho de codificación Cry2Ab.

Estos resultados confirman que el cartucho uidA le falta aproximadamente 260 bp del extremo 5´ del promotor CaMV 35S mejorado pero de otra manera esta intacto.

El ADN genómico aislado del evento MON15985, DP50B, DP50(control no transgénico)y DP50 mezclado con plásmido PV-GHBK11 ADN fue digerido con KpnI. El secado fue probado con la secuencia de estructura completa. La corrida larga DP50 no mostró ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con el ADN DP50 produjo una banda del tamaño esperado de 2,6 Kb para la estructura completa. Las corridas larga y corta DP50B produjeron una banda única en aproximadamente 22Kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento MON15985 y en el de control DP50B se considera que son

144 143

antecedentes asociados con el evento MON531. Las corridas larga y corta MON15985 contenían la banda de antecedente 22Kb sin ninguna hibridización adicional. Estos resultados establecen que el evento MON15985 no contiene ninguna secuencia de estructura de plásmido detectable.

El PCR fue llevado cabo sobre el ADN genómico para confirmar la unión inserto a planta en las secuencias en los extremos 5´ y 3´ del inserto MON15985. Como se esperaba, las muestras no transgénicas no llevaron a un producto PCR en el conjunto cebador 5´ ni 3´ que fue usado. La muestra DP50B usada como el control no produjo productos con ningún par de cebador como se esperaba. Un evento diferente preparado usando la misma construcción y seleccionando para la expresión de Cry2Ab, MON15813, tampoco produjo productos cuando cualquier conjunto de cebador fue usado. El ADN genómico MPN15985 produjo los productos de tamaño correcto cuando el extremo 5´ usando pares de cebador y el extremo 3´ con pares de cebador. Este análisis PCR confirmó que las secuencias de borde de 5´ y 3´ del MON15985.

El evento de algodón MON15985 protegido contra insectos fue producido por una tecnología de aceleración

de partículas usando un segmento de ADN de KpnI que contiene un cartucho que codifica Cry2Ab Y UidA. El evento MON15985 contiene un inserto de ADN único localizado sobre un fragmento ScaI en 9,3 Kb. Este insecto contiene una copia completa del cartucho insertado el cual le falta aproximadamente 20 bp en el extremo 5´ del promotor CaMV 35S mejorado llevando la expresión de la secuencia de codificación UidA. El PCR fue usado para verificar las secuencias de unión 5´ y 3´ del inserto con el genoma dela planta lo mismo que el que este intacto los extremos 5´ y 3´ del inserto. El evento MON15985 no contienen ninguna secuencia de estructura d plásmido detectable resultante del evento de transformación. Con base en las enzimas usadas en este estudio, el patrón de restricción del inserto cry2Ac no ha cambiado por la inserción del ADN insertado que comprende la secuencia de codificación cry2Ab.

Así, la SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17 Y SEC ID NO:18 y las secuencias que comprenden estas secuencias, son diagnosticadas para la inserción que dio lugar o nacimiento al evento MON15985 del algodón. Con referencia a la figura 1, estas

148, 145
146

secuencias se han referenciado con los números 2,4,6,9 y 11 respectivamente.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en esta especificación son indicativas del nivel de experticio de aquellos versados en la materia al cual esta invención pertenece. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes que se han incorporado aquí como referencia al mismo grado que las publicaciones que cada publicación individual o solicitud de patente individual fueron indicadas específica o individualmente para ser incorporadas como referencia.

Aunque la anterior invención ha sido descrita en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósito de claridad y entendimiento, es obvio que ciertos cambio y modificaciones pueden ser practicados dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

146

REIVINDICACIONES

1. Una planta de algodón resistente a los insectos, o partes de ella, la semilla de dicha planta de algodón que tiene depositada dentro que esta depositada con la American Type Culture Collection bajo el número de deposito PTA-2516.

2. Una planta de algodón resistente a los insectos, o partes de ella en donde el ADN que tiene por lo menos una secuencia nucleotida seleccionada a partir del grupo de SEC ID NO:14, SEC ID NO.15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18 forma parte del genoma de la planta.

3. Una planta descendiente de la planta de algodón resistente a los insectos de la reivindicación 1 en donde el ADN tiene por lo menos una secuencia de nucleótidos seleccionados a partir del grupo de SEC ID NO: 14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18 forma parte del genoma De la planta.

4. La semilla de una planta de las reivindicaciones 1,2 o 3.

5. Un método para producir una planta de algodón resistente a los insectos que comprende cultivar con una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1,2, o 3, y seleccionar progenie por medio de analizar al menos una secuencia de nucleotidos seleccionada a partir del grupo de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.

6. Una secuencia de ADN aislada comprende la SEC ID NO:14,la SEC ID NO.15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, o SEC ID NO:18.

7. Una secuencia de ADN aislada comprende la SEC ID NO:26,SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO:33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, o SEC ID NO:36.

8. Un par de secuencias de ADN aisladas, cada una comprende por lo menos 10 nucleótidos las cuales cuando se usan juntas en un procedimiento de amplificación de ADN producen un diagnostico amplicon para MON15985.

9. El par de secuencias de ADN aisladas de la reivindicación 8 en donde cada una es escogida de la SEC ID NO:11.

10. El par de secuencias de ADN aisladas de la reivindicación 8 en donde cada una es escogida de la SEC ID NO:12.

11. Un método para detectar la presencia de la inserción de MON15985 en el tejido de algodón comprende:

(a) seleccionar un par de cebadores cada uno comprende por lo menos 10 nucleótidos de la SEC ID NO: o SEC ID NO:!2 en donde cada miembro del par esta sobre lados opuestos de un diagnostico de secuencia para dicha inserción MON15985;

(b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con dicho par de cebadores;

(c) llevar a cabo la amplificación de ADN y analizar para encontrar amplicon.

12. El método de la reivindicación 11 en donde dicho par de cebadores se selecciona a partir del grupo que

consiste de SEC ID NO:26,SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO.33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, y SEC ID NO:36.

13. Un método para detectar la presencia De la inserción MON15985 en el tejido de algodón comprende.

(a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con una probeta de polinucleótidos que hibridiza bajo condiciones de hibridización extringente con uno o más secuencias de ADN seleccionadas a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18. SEC ID

(b) Someter la muestra y la probeta a condiciones de hibridización extringente;

(c) Analizar la hibridización de la probeta.

14. Un kit de detección de ADN que comprende una probeta de polinucleótidos que hibridiza bajo condiciones de hibridización extringente con una o más secuencias de ADN seleccionadas a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.

15. Un kit de detección de ADN que comprende un par de cebadores cada uno de los cuales comprende por lo menos 10 nucleótidos de la SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, en donde cada uno esta sobre lados opuestos de un diagnostico de secuencia para la inserción MON15985.

16. El kit de detección ADN de la reivindicación 15 en donde dicho par de cebadores esta seleccionado a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO.33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, y SEC ID NO:36.

151
152
+47

RESUMEN

La presente invención suministra plantas de algodón, tejidos de algodón, y semillas de algodón que incluyen el evento MON15985, que confiere resistencia a los daños del insecto Lepidopteran. También se ha suministrado ensayos para detectar la presencia del evento MON15985 con base en la secuencia de ADN de la construcción recombinante insertada dentro del genoma de algodón que resultó en el evento MON15985 y/o las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción.

152
153

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOM
WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com
TELEFONO: (57) (1) 347-3611

Radicacion : 02049630 00000003 Folios: 106
Fecha (AMD): 2002-08-15 16:52:24
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comerc
E. S. D.

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación: 444

Referencia : Expediente No. 02.049.630
Solicitante : **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**
Asunto : Solicitud de patente para **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO"**
Fecha de solicitud : 11 de junio de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al oficio número 13048, notificado por fijación en lista del 11 de julio de 2002.

2. Mediante el oficio número 13048 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. **Cesión de los inventores.** Presento junto con este escrito los documentos en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante, debidamente legalizados, junto con sus respectivas traducciones oficiales.

2.2. **Traducción de la solicitud.** Me permito informarle que la traducción al español de la presente solicitud fue presentada junto con mi memorial número 02049630 00000001 radicado el 14 de junio de 2002.

2.3. **Copia Certificada.** Presento con este escrito la copia certificada de la solicitud de patente estadounidense número 60/297,406 del 11 de junio de 2001, junto con su respectiva

CAVELIER
ABOGADOS

154 153

traducción de sus reivindicaciones y carátula, en la cual se basa la reivindicación de la prioridad.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, 15 AGO 2002

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
MRE/MRE/
ID-000009/WPC12746

154
A
155

PA 852614

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

June 11, 2002

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: ***60/297,406***
FILING DATE: ***June 11, 2001***

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

P. SWAIN
Certifying Officer

06-12-01 AIPROV

155

156

Express Mail # EL733950965US

Please type a plus sign (+) inside this box → [+]

PTO/SB/16 (8-00)
Approved for use through10/31/2002 OMB 0651-0032
U S Patent and Trademark Office; U.S DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

INVENTOR(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Scott	Huber	Creve Coeur, Missouri

☑ *Additional inventors are being named on the 1 separately numbered sheets attached hereto*

TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

Direct all correspondence to: **CORRESPONDENCE ADDRESS**

☑ Customer Number [ ] → *Place Customer Number Bar Code Label here*

OR *Type Customer Number here*

☐ Firm or Individual Name	27161 PATENT TRADEMARK OFFICE
Address	
Address	
City	State / ZIP
Country	Telephone / Fax

ENCLOSED APPLICATION PARTS *(check all that apply)*

☑ Specification *Number of Pages* 44 ☐ CD(s), Number

☑ Drawing(s) *Number of Sheets* 1 ☑ Other (specify) Sequence Listing (15 pages)

☐ Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76

METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

		FILING FEE AMOUNT ($)
☐ Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27.		
☐ A check or money order is enclosed to cover the filing fees		
☑ The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number:	13-4125	$150.00
☐ Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.		

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☑ No.

☐ Yes, the name of the U S Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE _____ Date 6/11/01

TYPED or PRINTED NAME Timothy K. Ball REGISTRATION NO. *(if appropriate)* 42,287

TELEPHONE (636) 737-7387 Docket Number: 38-21(52211)

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is used by the public to file (and by the PTO to process) a provisional application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the complete provisional application to the PTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C. 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

06/11/01 JC050 U.S. PTO
06/11/01 jc979 U.S. PTO 60/297406
10 of 50 Sutton 62205

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET
Additional Page

PTO/SB/16 (8-00)
Approved for use through 10/31/2002. OMB 0651-0032
U.S Patent and Trademark Office; U.S DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Docket Number	38-21(52211)	Type a plus sign (+) inside this box →	+

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Given Name (first and middle [if any])	Family or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
James K.	Roberts	Chesterfield, Missouri
Zachary	Shappley	Wildwood, Missouri

Number 1 of 1

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

Express Mail #EL733950965US

PTO/SB/17 (11-00)
Approved for use through 10/31/2002 OMB 0651-0032
U S Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

FEE TRANSMITTAL for FY 2001

Patent fees are subject to annual revision.

TOTAL AMOUNT OF PAYMENT ($) 150.00

Complete if Known	
Application Number	Unknown
Filing Date	June 11, 2001
First Named Inventor	Scott Huber
Examiner Name	Unknown
Group Art Unit	Unknown
Attorney Docket No.	38-21(52211)

METHOD OF PAYMENT

1. [x] The Commissioner is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayments to:
   - Deposit Account Number: 13-4125
   - Deposit Account Name: Monsanto Company
   - [x] Charge Any Additional Fee Required Under 37 CFR 1.16 and 1.17
   - [ ] Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27
2. [ ] **Payment Enclosed:** [ ] Check [ ] Credit card [ ] Money Order [ ] Other

FEE CALCULATION

1. BASIC FILING FEE

Large Entity Fee Code	Large Entity Fee ($)	Small Entity Fee Code	Small Entity Fee ($)	Fee Description	Fee Paid
101	710	201	355	Utility filing fee	
106	320	206	160	Design filing fee	
107	490	207	245	Plant filing fee	
108	710	208	355	Reissue filing fee	
114	150	214	75	Provisional filing fee	150.00

SUBTOTAL (1) ($) 150.00

2. EXTRA CLAIM FEES

	Extra Claims		Fee from below	Fee Paid
Total Claims	-20** =	X		=
Independent Claims	- 3** =	X		=
Multiple Dependent				=

Large Entity Fee Code	Large Entity Fee ($)	Small Entity Fee Code	Small Entity Fee ($)	Fee Description
103	18	203	9	Claims in excess of 20
102	80	202	40	Independent claims in excess of 3
104	270	204	135	Multiple dependent claim, if not paid
109	80	209	40	** Reissue independent claims over original patent
110	18	210	9	** Reissue claims in excess of 20 and over original patent

SUBTOTAL (2) ($) 0

**or number previously paid, if greater; For Reissues, see above

FEE CALCULATION (continued)

3. ADDITIONAL FEES

Large Entity Fee Code	Large Entity Fee ($)	Small Entity Fee Code	Small Entity Fee ($)	Fee Description	Fee Paid
105	130	205	65	Surcharge - late filing fee or oath	
127	50	227	25	Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	
139	130	139	130	Non-English specification	
147	2,520	147	2,520	For filing a request for *ex parte* reexamination	
112	920*	112	920*	Requesting publication of SIR prior to Examiner action	
113	1,840*	113	1,840*	Requesting publication of SIR after Examiner action	
115	110	215	55	Extension for reply within first month	
116	390	216	195	Extension for reply within second month	
117	890	217	445	Extension for reply within third month	
118	1,390	218	695	Extension for reply within fourth month	
128	1,890	228	945	Extension for reply within fifth month	
119	310	219	155	Notice of Appeal	
120	310	220	155	Filing a brief in support of an appeal	
121	270	221	135	Request for oral hearing	
138	1,510	138	1,510	Petition to institute a public use proceeding	
140	110	240	55	Petition to revive - unavoidable	
141	1,240	241	620	Petition to revive - unintentional	
142	1,240	242	620	Utility issue fee (or reissue)	
143	440	243	220	Design issue fee	
144	600	244	300	Plant issue fee	
122	130	122	130	Petitions to the Commissioner	
123	130	123	130	Petitions related to provisional applications	
126	180	126	180	Submission of Information Disclosure Stmt	
581	40	581	40	Recording each patent assignment per property (times number of properties)	
146	710	246	355	Filing a submission after final rejection (37 CFR § 1.129(a))	
149	710	249	355	For each additional invention to be examined (37 CFR § 1.129(b))	
179	710	279	355	Request for Continued Examination (RCE)	
169	900	169	900	Request for expedited examination of a design application	

Other fee (specify) _____

*Reduced by Basic Filing Fee Paid SUBTOTAL (3) ($) 0

SUBMITTED BY				Complete (if applicable)	
Name (Print/Type)	Timothy K. Ball	Registration No. (Attorney/Agent)	42,287	Telephone	(636) 737-7387
Signature				Date	6-11-01

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

Burden Hour Statement. This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

CERTIFICATE UNDER 37 C.F.R. §1.10

I hereby certify that the documents enclosed herein are being deposited with the United States Postal Service on this 11 day of June, 2001 in an envelope as "Express Mail Post Office to Addressee" Mailing Label Number EL733950965US addressed to: BOX PROVISIONAL APPLICATION, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Timothy K. Ball

In re application of: Huber et al.
Serial No.: Unknown
Filed: June 11, 2001
For: Cotton Event MON15985 and Compositions and Methods for Detection Thereof

Examiner: Unknown
Group Art Unit: Unknown

BOX PROVISIONAL APPLICATION
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL LETTER

Transmitted herewith are the following documents in the above-identified application.

X Provisional Application for Patent Cover Sheet;
X Fee Transmittal for Year 2001;
X Provisional Patent Application;
X Paper Copy of Sequence Listing;
X If an extension or an additional extension of time is required, but is not enclosed, please consider this a conditional petition therefor and charge Deposit Account 13-4125 accordingly.
X Please charge the $150.00 fee to Deposit Account 13-4125.
X Please charge any deficiencies or credit any overpayment to Deposit Account 13-4125. A duplicate copy of this sheet is attached.

Respectfully submitted,

Timothy K. Ball, Ph.D., J.D.
Reg. No. 42,287
Corporate Counsel - Monsanto Company
700 Chesterfield Parkway North
Mail Zone BB1L
Chesterfield, Missouri 63198
(636) 737-7387

Express Mail #EL733950965US

159
160

IN THE UNITED STATES PATENT OFFICE

A

PROVISIONAL APPLICATION

FOR

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

INVENTORS:

SCOTT HUBER
JAMES K. ROBERTS
&
ZACHARY SHAPPLEY

DC: 5954105 v1 - 6/20/2005

FIELD OF THE INVENTION

This invention is related to the field of plant molecular biology, and in particular to plant insect protection and plant breeding, and is directed to a novel transformation event of cotton plants, *Gossypium hirsutum*, comprising at least one polynucleotide sequence inserted into a specific site within the genome of a cotton cell, said sequence encoding a Cry2Ab lepidopteran insect inhibitory protein. Additionally, the invention is related to cotton plants derived from transformation events designated as MON15985, MON15985X, and MON531, and to assays for detecting the presence of these cotton events, their nucleic acid complement, or protein produced from their respective event specific DNA, in a sample.

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to the Lepidopteran resistant cotton plant (*Gossypium hirsutum)* event MON531 expressing a chimeric form of a Cry1A insect inhibitory protein and derivative events thereof comprising MON15985 and MON15985X, each of which expresses a Cry2A insect inhibitory protein. Additionally, the invention relates to the plants as designated, progeny and plant parts thereof, and to methods for the detection of the transgene or genomic insertion regions in said cotton line events and in progeny and plant parts thereof, as well as to methods for detecting the products of the transgenes inserted into the cotton genome within these specific cotton lines.

Cotton is a commercially valuable textile and is best known as a fiberous composition produced by cotton plants of, or related to the genus and species *Gossypium hirsutum.* Cotton plants are susceptible to insect infestation in all areas of the world in which the plants are cultivated. Recombinant DNA technology has been applied to cells of the cotton plant for about a decade, and cotton plants which exhibit improved characteristics as a result of the insertion of heterologous DNA sequences have been produced using recombinant DNA technology since about the early 1990's. Some of the improvements exhibited by recombinant cotton plants consist of herbicide tolerance, improved fiber characteristics, and resistance to insect infestation.

The first recombinant cotton plants protected from *Lepidopteran* insect infestation were produced, approved by regulatory agencies for commercial distribution, and subsequently commercialized in 1996. These cotton plants contained a DNA sequence encoding a chimeric

Cry1A lepidopteran insect inhibitory protein. This particular trait, along with an adjacent linked DNA sequence encoding a selectable marker, has been transferred by conventional breeding into a number of cotton varieties, each of which are particularly suited for enhanced production of cotton in diversified geographic locations throughout the world. These recombinant varieties have enjoyed a tremendous commercial success for a number of reasons. One reason is that yields per acre of cotton production have on average improved dramatically because of reduced insect infestation as a result of the presence of the insect inhibitory protein present within each cell of the cotton plant. Another principle reason for the commercial success has been the reduced labor and expense due to the reduction in over the top applications of chemical pesticides required to protect the crop from insect infestation. In addition, the reduction in chemical pesticide applications improves the overall health of the environment by avoiding the annihilation of insects or arachnids and other species which present no threat to the crop in the field, reduces the load of chemical pesticide toxins applied to the environment, and allows the farmer to avoid the risk associated with the potentially harmful effects of exposure to chemical pesticides.

A caveat, however, to the introduction of an insect resistance trait into a crop species is the concern related to the development of insect resistance. The management of the development of resistance, known as insect resistance management, has been a principle concern of the agricultural community. Not long after the introduction of chemical pesticide applications to crop fields in the late 1800's and early 1900's, it was noted that insect species adapted rapidly to the pesticides in their environment so that individuals which survived a particular dose of chemical pesticide would give rise to a rapid increase in populations of insects which were tolerant to the insecticide chemical. The only means of managing the development of races of insect pests which exhibited resistance to chemical pesticide applications was to apply high levels of two or more chemical insecticides simultaneously, each insecticide exerting its activity through a mode of action different from the other pesticide(s) in the composition, whenever insect infestation was observed to be problematic during a growing season. Theoretically, a population of insect pest species would not be able to develop resistance to both chemical pesticides in a mixture and so the combination would result in the control not only of insect infestation but also of the problem related to the development of populations of insects resistant to either of the chemical pesticides. Yet, utilizing the chemical

insecticide applications in this manner resulted in a greater sterilization of the crop fields because virtually all arachnid and insect species, i.e., pest species and species beneficial to the field or otherwise, were exterminated.

A more practical solution has been to combine two or more insect inhibitory proteins toxic to the same insect species together in a single plant to achieve a means similar to the combinatorial chemistries described above, for combating the development of pests resistant to insect inhibitory proteins present in a particular variety of recombinant insect resistant cotton. While it may be seen as obvious in view of the chemical arts to provide a combination of insect inhibitory proteins for resistance management purposes, both of which are toxic to the same insect pest species feeding on a particular plant, in reality the development of a plant meeting these characteristics is problematic, and requires a great deal of resources, technical ability, and trial and error experimentation in order to obtain a single recombinant plant transformation event which results in a morphologically normal recombinant plant exhibiting the desired combination of insect inhibitory proteins produced in sufficient levels and at appropriate times during the plant growing season and in the tissues upon which target pest species feed.

Thus, there exists a need for the development and characterization of cotton plants exhibiting the characteristics of enhanced insect resistance as a result of the presence of two or more insect inhibitory proteins produced from DNA sequences incorporated into the genome of the plant cells. Furthermore, it would be desirable for the insect inhibitory traits to segregate independent of one another, to not cause any adverse effects upon the physiology and metabolism of the plant, and to have little if any effect upon the yield or quality of the fiber produced from said plant.

Cotton event MON531, which contains a cassette encoding a chimeric Cry1A protein and a selectable marker, was transformed with a different expression cassette encoding a Cry2Ab insect control protein. Cotton plants expressing both the chimeric Cry1A and Cry2Ab proteins have improved insecticidal efficacy, an expanded range of insect control, and provide enhanced Insect Resistance Management options to the grower.

The expression of foreign genes in plants is known to be influenced by their chromosomal position, perhaps due to chromatin structure (e.g., heterochromatin) or the proximity of transcriptional regulation elements (e.g., enhancers) close to the integration site (Weising *et al.*, 1988, "Foreign Genes in Plants," *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477). It is likely

that many insertional events create genetic instability, or for any number of reasons create problems in plants derived from such events including but not limited to chlorosis, stunting, and infertility. In any event, and at least for these reasons, it is often necessary to screen a large number of transformation events in order to identify a morphologically normal event characterized by optimal expression of an introduced gene of interest. For example, it has been observed in plants and in other organisms that there may be wide variations in levels of expression of an introduced gene among individually selected events. There may also be differences in spatial or temporal patterns of expression, for example, differences in the relative expression of a transgene in various plant tissues, that may not correspond to the patterns expected from transcriptional regulatory elements present in the introduced gene construct. For this reason, it is common to produce hundreds to thousands of different events and screen those for a single event that has desired transgene expression levels and patterns for commercial purposes. An event that exhibits the desired levels or patterns of transgene expression is useful for introgressing the transgene into other genetic backgrounds by sexual outcrossing using conventional breeding methods. Progeny of such crosses are expected to maintain the transgene expression characteristics of the original transformant. This strategy is used to ensure reliable gene expression in a number of varieties that are well adapted to local growing conditions.

It would be advantageous to be able to detect the presence of a particular event in order to determine whether progeny of a sexual cross contain a transgene of interest. In addition, a method for detecting a particular event would be helpful for complying with regulations requiring the pre-market approval and labeling of foods derived from recombinant crop plants, for example, or for use in environmental monitoring, monitoring traits in crops in the field, or monitoring products derived from a crop harvest, as well as for use in ensuring compliance of parties subject to regulatory or contractual terms.

It is possible to detect the presence of a transgene by any nucleic acid detection method known in the art including but not limited to thermal amplification (PCR™) or DNA hybridization using nucleic acid probes. Typically, for the sake of simplicity and uniformity of reagents and methodologies for use in detecting a particular DNA construct that has been used for transforming various plant varieties, these detection methods generally focus on frequently used genetic elements, such as promoters, terminators, marker genes, etc., because

for many DNA constructs, the coding sequence region is interchangeable. As a result, such methods may not be useful for discriminating between separate events produced as a result of using constructs which differ only with reference to as little as the coding sequence. In addition, such methods may not be useful for discriminating between different events, particularly those produced using the same DNA construct unless the sequence of chromosomal DNA adjacent to the inserted DNA ("flanking DNA") is known. An event-specific thermal amplification (PCR™) assay is discussed, for example, by Windels et al. (*Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent* 64/5b:459-462, 1999), who identified glyphosate tolerant soybean event 40-3-2 using a thermal amplification primer set spanning the junction between the insert and flanking DNA. Specifically, one primer included sequence from within the insert and a second primer included sequence from flanking DNA.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to one aspect of the invention, compositions and methods are provided for detecting the presence of various transgene/genomic insertion regions from cotton plants designated as cotton event MON531, and cotton event MON15985 or a segregant variety derived from MON15985 designated as MON15985X.

DNA sequences are provided that comprise at least one junction sequence of MON531 selected from the group identified as SEQ ID NO:1 [5'GCGTT TCTGG TTATA ATATA3'] and SEQ ID NO:2 [5'CTTCT CTGCT AAGTG GGTCA3'] and complements thereof; wherein a junction sequence spans the point at which heterologous DNA inserted into the genome is linked to DNA from the cotton cell genome flanking the insertion point, the junction sequence(s) being diagnostic for the event.

Another aspect of the invention are various combinations of the DNA sequences that comprise at least 11 or more contiguous nucleotides of the DNA sequence of SEQ ID NO:3

```
[agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca     60
tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt    120
actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg    180
taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg    240
ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca    300
ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa    360
cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac    420
acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg    480
```

taggcacctc cgtactcttc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540
ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600
tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660
tagcctctac ctggacagac tctaacctct tgggacactt cagcttccca ctcaggcaca 720
accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 780
cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 840
aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 900
acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 960
atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 1020
tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1080
ttgtccctcc acttcttctc tgct 1104];

SEQ ID NO:4

[aagtgggtca gtggggtggc attggttttt aatttcaacg cgttttgtcg catatacttt 60
tatgattggg gttttctttt ggtgtacatc aatgaccttc cctattgcat tgtctgaatt 120
ttcatctctt aaatcggcta aaaaacaact atgaaaaaaa gagtaggcct actcatccgt 180
accggggagg gggggggaa tggaggaaat agaatagggg actcatttat atatatataa 240
accaagtatg ttattggttg atcgagtggg aaggaattca atgttcaatt ctgggtttga 300
aacttgctt 309];

SEQ ID NO:5

[cccctcaaat gtcaataggt gcgcccctca tctgtcagca ctctgcccct caagtgtcaa 60
ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact 120
tatccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc 180
gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt 240
caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgcccctc atctgtcagt 300
gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg 360
cttcgacggc gttttctgg 378];

and SEQ ID NO:6

[ttataatata cacatatata atttatcact gtatattctt gcagagaaca atcacgaggc 60
attggccccc ccatttttt aaaaaaaatt tgatctgata gagaaaagaa agaaagaaaa 120
agaagaatat tagtgacctt tcaatggtga aaaatcaaaa aaaaatctca tttaatgata 180
aacaaaatgt caaacagtct gacagctcct g 211];

each respectively designated otherwise as the sequence of the insert at the 5' end; the cotton genome sequence flanking the 5' end of the inserted sequence; the sequence of the insert at the 3' end; and the cotton genome sequence flanking the 3' end of the inserted sequence and complements thereof for use as DNA primers in DNA amplification methods. Appropriate amplicons produced using such primers are diagnostic for cotton event MON531. Examples of such primers are

SEQ ID NO:7 [gccaatgcct cgtgattgtt ctctgc], and

SEQ ID NO:8 [gatttgcgag gctggccagc tccacg].

Sequence from which amplification primers can be selected are at least

SEQ ID NO:9

[cccctcaaat gtcaataggt gcgcccctca tctgtcagca ctctgcccct caagtgtcaa 60

ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact 120

tatccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc 180

gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt 240

caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgcccctc atctgtcagt 300

gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg 360

cttcgacggc gtttctggtt ataatataca catatataat ttatcactgt atattcttgc 420

agagaacaat cacgaggcat tggcccctcc attttttaa aaaaaatttg atctgataga 480

gaaaagaaag aaagaaaaag aagaatatta gtgacctttc aatggtgaaa aatcaaaaaa 540

aaatctcatt taatgataaa caaaatgtca aacagtctga cagctcctg 589],

and

SEQ ID NO:10

[agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca 60

tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt 120

actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg 180

taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg 240

ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca 300

ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa 360

cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac 420

acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg 480

taggcacctc cgtactcttc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540

ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600

tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660

tagcctctac ctggacagac tctaacctct tgggacactt cagcttccca ctcaggcaca 720

accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 780

cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 840

aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 900

acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 960

atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 1020

tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1080

ttgtcctcc acttcttctc tgctaagtgg gtcagtgggg tggcattggt ttttaatttc 1140

aacgcgtttt gtcgcatata cttttatgat tggggtttct ctttggtgta catcaatgac 1200

cttccctatt gcattgtctg aattttcatc tcttaaatcg gctaaaaaac aactatgaaa 1260

aaaagagtag gcctactcat ccgtaccggg gagggggggg ggaatggagg aaatagaata 1320

ggggactcat ttatatatat ataaaccaag tatgttattg gttgatcgag tgggaaggaa 1380

ttcaatgttc aattctgggt ttgaaacttg c 1411].

The amplicons produced by said DNA primers are also an aspect of the invention.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the cotton event MON531 in a sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the sample comprising DNA with a primer set that, when used in a nucleic acid amplification reaction with DNA from cotton event MON531, produces an amplicon that is diagnostic for cotton event MON531; (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of a DNA corresponding to the MON531 event in a sample, such methods comprising: (a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with DNA from cotton event MON531 and does not hybridize under stringent hybridization conditions with a control cotton plant DNA, i.e., using other than MON531 DNA; (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

According to one aspect of the invention, DNA sequences are provided that comprise at least one junction sequence of cotton event MONMON15985 or MON15985X selected from the group consisting of SEQ ID NO:14 [tgaaatgggt ttattcgtat], SEQ ID NO:15 [acgaaggagt tcttttaggc], SEQ ID NO: 16 [atatctctat aaagggtaat], SEQ ID NO: 17 [ctagtggatc tgcactgaaa], and SEQ ID NO: 18 [caaagtaggg gttgttggta], and complements thereof. These sequences correspond to diagnostic features within the chromosome of plants comprising MON15985 or MON15985X genetic material. SEQ ID NO:14 corresponds to a 5' end diagnostic junction sequence between native and contiguous cotton genomic 5' end DNA flanking the inserted DNA, which is linked to the 5' end of a chloroplast related DNA sequence near the 5' end of the inserted DNA. SEQ ID NO:15 corresponds to a 5' end diagnostic junction sequence between the 3' end of chloroplast related

DNA sequence linked to the 5' end of the 5' end cotton genomic remnant sequence positioned immediately 5' to the inserted 5' DNA end. SEQ ID NO:16 corresponds to a 5' end diagnostic junction sequence between the 3' end of the 5' end cotton genomic remnant DNA sequence and the 5' end of the inserted DNA sequence (i.e., the 5' end of the inserted DNA sequence is represented by a 35S promoter sequence driving expression of GUS from within the inserted DNA). SEQ ID NO:17 corresponds to a 3' end diagnostic junction sequence between the 3' end of the inserted DNA and the 5' end of the 3' end cotton genomic remnant DNA sequence which is positioned between the inserted DNA and the cotton genomic DNA flanking the 3' end of the inserted DNA. SEQ ID NO:18 corresponds to a 3' end diagnostic junction sequence between the 3' end of the 3' end cotton genomic remnant DNA sequence and the cotton genomic DNA sequence flanking the 3' end of the inserted DNA.

It should be noted that the identification or detection of a sequence diagnostic for cotton event MON15985X is insufficient to be diagnostic for cotton event MON15985. MON15985X is a variant of MON15985 containing a complement of genetic material substantially equivalent to MON15985 but which has been segregated away from the diagnostic sequences comprising cotton event MON531 which are also present in MON15985. Therefore, detection or identification of sequences which are diagnostic for cotton event MON15985X is insufficient to conclude that cotton event MON15985 DNA has been identified. One or more cotton event MON531 sequences must also be identified or detected in order for a detection or identification of sequences corresponding to cotton event MON15985X to also be diagnostic for cotton event MON15985.

A junction sequence herein spans the point at which heterologous DNA inserted into the genome is linked to DNA from the cotton cell genome flanking the insertion point, the identification or detection of one or more junction sequences in a plants' genetic material being sufficient to be diagnostic for the event. Included are DNA sequences that comprise at least 10 or more (e.g., 15, 25, 50) nucleotides of insert sequence from cotton event MON15985 or MON15985X and similar length of flanking DNA from these cotton event . Also included are DNA sequences which comprise 15 or more nucleotides of contiguous insert sequence from cotton event MON15985X and at least one nucleotide of flanking DNA from cotton event MON15985X adjacent to the insert sequence. Such DNA sequences are diagnostic for cotton event MON15985X. Nucleic acid amplification of genomic DNA from

the event produces an amplicon comprising such diagnostic DNA sequences. In addition, detection the binding of oligonucleotides which bind specifically to the diagnostic sequences described herein is also diagnostic for the event.

According to another aspect of the invention, cotton plants and seeds comprising such DNA sequences which are diagnostic for cotton event MON15985X and MON15985 are provided. The cotton seeds comprising sequences diagnostic for the presence of cotton event MON15985X and MON15985 DNA were deposited on September 29, 2000 with the American Type Culture Collection and are designated as ATCC accession number PTA-2516.

According to another aspect of the invention, oligonucleotide sequence primer pairs for distinguishing cotton event MON15985 and MON15985X from the native, nontransformed, and undisturbed sequence within the wild type sequence within the genome of at least a variety of cotton comprising DeltaPine 50 are provided. In particular, such flanking sequence primers pairs comprise at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from about base pair positions 1-361 as set forth in SEQ ID NO:11, the sequence disclosed herein as the cotton genomic DNA sequence flanking the 5' end of the inserted DNA as depicted in Figure 1, and at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from about base pair positions 674-1361 as set forth in SEQ ID NO:11, the sequence disclosed herein as the cotton genomic DNA sequence flanking the 3' end of the inserted DNA as depicted in Figure 1. In addition, flanking sequence primer pairs for detecting cotton event MON15985 and event MON15985X DNAs, and for distinguishing DNA from these events from cotton DNA not containing sequences diagnostic for these events are provided. Such flanking sequence primer pairs comprise at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 1-1885 of SEQ ID NO:11 paired with at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 362-2267of SEQ ID NO:11, or primer pairs comprising at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 1-673 of SEQ ID NO:12 paired with at least one isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides from nucleotides 350-1361 of SEQ ID NO:12.

According to another aspect of the invention, primer sets that are useful for nucleic acid amplification, for example, are provided. Such primer sets comprise the above-described

flanking sequence primers and an isolated nucleic acid comprising at least 15 contiguous nucleotides of insert sequence of the cotton events MON15985 and MON15985X. For example, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27 produce an amplicon which is diagnostic for the presence of cotton event MON15985X DNA, and SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29 produce yet another amplicon which is diagnostic for the presence of cotton event MON15985X DNA. In contrast, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:29 are capable of producing an amplicon from DNA samples obtained from other than cotton event MON15985X or MON15985, and from hemizygous genomes comprising the wild type sequence at the point at which the MON15985 sequence integrated into the genome as well as the MON15985 integrant sequence, and said amplicon would appear to be diagnostic for the lack of cotton event MON15985X or MON15985 DNA in a sample, and produce no amplicon in a sample containing . Caution should be exercised in interpreting such a result, however, and one skilled in the art would recognize that when present as a hemizygous member of a chromosome pair, the use of SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:29 as a diagnostic tool for proving a negative or a positive may be erroneous.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the cotton event MON15985 or MON15985X in a sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the sample comprising DNA with a primer set that, when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from cotton event MON15985 or MON15985X, produces an amplicon that is diagnostic for cotton event MON15985X; (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon.

According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the cotton event MON15985X in a sample, such methods comprising: (a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from cotton event MON15985X and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with DNA from a control cotton plant; (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the DNA.

Another aspect of the present invention is methods and compositions for detecting the presence of a target site, i.e., at least one of the junctions, identification or detection of which

would be diagnostic for the presence of the integrated DNA with the genomic of the cotton plant in the cotton event MON15985X, in a sample of nucleic acid derived from or obtained from the genome of the cotton event MON15985X, using a variety of detection methods including TAQMAN (Perkin Elmer) or related flourophore/quencher methodologies, thermal amplification, ligase chain reaction, southern hybridization, ELISA methods, and colorimetric and fluorescent detection methods. In particular, the present invention provides for kits for detecting the presence of the target sequence, i.e., at least one of the junctions of the insert DNA with the genomic DNA of the cotton plant in the cotton event MON15985X, in a sample containing genomic nucleic acid from the cotton event MON15985X. The kit is comprised of at least one polynucleotide capable of binding to the target site or substantially adjacent to the target site and at least one means for detecting the binding of the polynucleotide to the target site. The detecting means can be selected from the group consisting of fluorescent, chemiluminescent, colorimetric, or isotopic and can be coupled at least with immunological methods for detecting the binding. A kit is also envisioned which can detect the presence of a target site in a sample, i.e., at least one of the junctions of the insert DNA with the genomic DNA of the cotton plant in the MON15985 event, taking advantage of two or more polynucleotide sequences which together are capable of binding to nucleotide sequences adjacent to or within about 100 base pairs, or within about 200 base pairs, or within about 500 base pairs or within about 1000 base pairs of the target sequence and which can be extended toward each other to form an amplicon which contains at least the target site.

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

DRAWINGS

Figure 1 illustrates a summary of the sequence alignment for the DNA flanking the inserted sequence encoding Cry2Ab in cotton event MON15985. The inserted DNA is depicted as described herein, 5' from the left through 3' to the right. Individual DNA sequences identified herein are labeled accordingly. 1) corresponds to the position of the 5' end flanking genome sequence as set forth in SEQ ID NO:19; 2) corresponds to a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:14 between the 5' end flanking genome sequence and the

following chloroplast related DNA sequence; 3) corresponds to the position of the chloroplast related sequence positioned 5' the inserted sequence as set forth in SEQ ID NO:20; 4) corresponds to a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:15 between the 3' end of the chloroplast related DNA sequence and the following remnant cotton genome related sequence; 5) corresponds to the position and sequence of the 5' end remnant of cotton genome sequence positioned immediately 3' to the 5' end of the inserted sequence; 6) corresponds to a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:16 between the 3' end of the 5' end remnant cotton genome sequence and the 5' end of the inserted DNA sequence; 7) corresponds to the position of a portion of the 5' end of the inserted sequence as set forth in SEQ ID NO:22; 8) corresponds to the position of a portion of the 3'end of the inserted sequence as set forth in SEQ ID NO:23; 9) corresponds to a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:17 between the 3' end of the inserted sequence and the 5' end of a 3' end related remnant cotton genome sequence; 10) corresponds to the position of the 3' end related remnant cotton genome sequence; 11) corresponds to a diagnostic sequence as set forth in SEQ ID NO:18 between the 3' end of the 3' end related remnant cotton genome sequence and the 3' genome sequence flanking the inserted DNA sequence; 12) corresponds to the position of the sequenced portion of the 3' end cotton genome flanking the 3' end of the inserted DNA sequence, as set forth in SEQ ID NO:25.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Cotton, *Gossypium hirsutum*, has been genetically modified to resist *Lepidopteran* pests, which have a negative impact on cotton production. This was accomplished by the insertion of a first DNA cassette that encodes the insecticidal Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* and a second DNA cassette that encodes the insecticidal Cry2Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. This invention relates preferably to plants, plant parts, progeny plants which contain at least the sequences comprising the second DNA cassette, and to methods and compositions of matter for use in detecting the presence of said sequences in a sample.

The first DNA cassette was inserted into the genome of cotton cultivar Coker 312 through *Agrobacterium sp* transformation using a DNA fragment derived from plasmid PV-GHBK04 (pMON10518 in U.S. Patent No. 5,500,365) to produce cotton event MON531, which has been down bred with many different cotton varieties and successfully introduced in

cotton markets around the world. Cotton event MON531 was retransformed using particle acceleration technology with a gel purified linear DNA fragment, i.e., the second cassette indicated herein and above, from plasmid PV-GHBK11, which contained cry2Ab and β-glucuronidase (uidA) coding regions. (John, M.E. 1997. *Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering*. Critical Reviews in Biotechnology, 17 (3): 185-208). The uidA was used as a selectable marker to aid in identifying cells which contained the cry2Ab2 coding region. The cry2Ab coding region derived from plasmid PV-GHBK11 comprises the cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with a duplicated enhancer region (U.S. Patents 5,530,196; 5,424,200; and 5,359,142) operably connected to a petunia heat shock protein untranslated leader sequence (PetHSP70-leader) operably connected or linked to the N-terminal chloroplast transit peptide from *Arabidopsis* thaliana EPSPS gene (AEPSPS/CTP2) (Van den Broeck, et. al. 1985. *Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*. Nature 313, 358-63.) operably connected or linked to a synthetic seqeuence endocing Cry2Ab (Widner, W.R. and Whiteley, H.R. 1990. *Location of the Dipteran Specificity Region in a Lepidopteran-Dipteran Crystal Protein from Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol. 172, 2826-32.) which is operably connected or linked to the 3' nontranslated region of the nopaline synthase (NOS) gene from *Agrobacterium tumifaciens* which terminates transcription and directs polyadenylation (Fraley, R.T., et al. 1983. *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 80 (15), 4803-07.). The β-glucuronidase coding region is also controlled by an enhanced CaMV 35S promoter and a NOS 3' polyadenylation sequence. The insertion of the cassette, or substantially all of the cassette, containing the Cry2Ab and UidA coding sequences into the cotton event MON531 gave rise to a single event designated as MON15985 which comprises both the Cry1A coding sequence as well as the cassette encoding the Cry2Ab coding sequence. Because the cassettes encoding these proteins were introduced in separate transformations, and because the cotton genome consists of several chromosomes comprising the total nuclear genome, the likelihood that the second cassette would insert near to or within the same chromosome as the Cry1A coding sequence was very low. Furthermore, genetic analysis of the MON15985 event has demonstrated that the two inserted cassettes can be segregated, the segregants giving rise to the original MON531 event genotype as well as a second genotype designated as MON15985X comprising only the Coker

312 genetic background containing a single cassette incorporated into the nuclear genome which is responsible for encoding the Cry2Ab protein. It is the transformation event giving rise to the cotton genotype MON15985 as well as the MON15985X genotype which are intended as the subject matter of this invention.

The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of common terms in molecular biology may also be found in Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994. The nomenclature for DNA bases as set forth at 37 CFR § 1.822 is used.

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

Event

As used herein a transgenic "event" refers to a recombinant plant produced by transformation of plant cells with heterologous DNA, i.e., a nucleic acid construct that includes a transgene of interest, regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant, and selection of a particular plant characterized by insertion into a particular genome location. The term "event" refers to the original transformant and progeny of the transformant that include the heterologous DNA. The term "event" also refers to progeny produced by a sexual outcross between the transformant and another variety that include the heterologous DNA. Even after repeated backcrossing to a recurrent parent, the inserted DNA and flanking DNA from the transformed parent is present in the progeny of the cross at the same chromosomal location. The term "event" also refers to DNA from the original transformant comprising the inserted DNA and flanking sequence immediately adjacent to the inserted DNA that would be expected to be transferred to a progeny that receives inserted DNA including the transgene of interest as the result of a sexual cross of one parental line that includes the inserted DNA (e.g., the original transformant and progeny resulting from selfing) and a parental line that does not contain the inserted DNA.

Probes and Primers

A "probe" is an isolated nucleic acid to which is attached a conventional detectable label or reporter molecule, *e.g.*, a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. Such a probe is complementary to a strand of a target nucleic acid, in the case of the present invention, to a strand of genomic DNA from cotton event MON15985 (whether from a cotton plant or from a sample that includes DNA from the event). Probes according to the present invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and can be used to detect the presence of that target DNA sequence.

"Primers" are isolated nucleic acids that are annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, then extended along the target DNA strand by a polymerase, *e.g.*, a DNA polymerase. Primer pairs or sets can be used for amplification of a nucleic acid sequence, *e.g.*, by the polymerase chain reaction (PCR™), also known as thermal amplification methods, or other conventional nucleic-acid amplification methods.

Probes and primers are generally 15 nucleotides or more in length, preferably 20 nucleotides or more, more preferably 25 nucleotides, and most preferably 30 nucleotides or more. Such probes and primers hybridize specifically to a target sequence under high stringency hybridization conditions. Preferably, probes and primers according to the present invention have complete sequence complementarity with the target sequence, although probes differing from the target sequence and which retain the ability to hybridize to target sequences may be designed by conventional methods.

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

Primers and probes based on the flanking DNA and insert sequences disclosed herein can be used to confirm (and, if necessary, to correct) the disclosed sequences by conventional methods, *e.g.*, by re-cloning and sequencing such sequences.

Nucleic-Acid Hybridization; "Stringent Conditions"; "Specific"

The nucleic-acid probes and primers of the present invention hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of DNA from a transgenic event in a sample.

The term "stringent conditions" is functionally defined with regard to the hybridization of a nucleic-acid probe to a target nucleic acid (i.e., to a particular nucleic-acid sequence of interest) by the specific hybridization procedure discussed in Sambrook *et al.*, 1989, at 9.52-9.55. *See also*, Sambrook *et al.*, 1989 at 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, *Nucl. Acids Res.* 12:203-213, 1984; and Wetmur and Davidson, *J. Mol. Biol.* 31:349-370, 1968.

Regarding the amplification of a target nucleic- acid sequence (*e.g.*, by PCR™) using a particular amplification primer pair, "stringent conditions" are conditions that permit the primer pair to hybridize only to the target nucleic-acid sequence to which a primer having the corresponding wild-type sequence (or its complement) would bind and preferably to produce a unique amplification product.

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

Nucleic-Acid Amplification

As used herein, "amplified DNA" or "amplicon" refers to the product of nucleic-acid amplification of a target nucleic-acid sequence that is part of a nucleic acid template. For example, to determine whether the cotton plant resulting from a sexual cross contains an transgenic event genomic DNA from a cotton plant may be subjected to nucleic acid amplification using a primer pair that includes a primer derived from flanking sequence in the genome of the plant adjacent to the insertion site of inserted heterologous DNA and a second primer derived from the inserted heterologous DNA to produce an amplicon that is diagnostic for the presence of the event (e.g., the amplicon is of a length and has a sequence that is diagnostic for the event). Alternatively, a primer pair can be derived from flanking sequence

on both sides of the inserted DNA so as to produce an amplicon that includes the entire insert.

Nucleic-acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic-acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR™). A variety of amplification methods are known in the art and are described, *inter alia*, in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202 and in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. Any well known method for nucleic acid amplification may be used in the practice of the present invention.

The sequence of the heterologous DNA insert or flanking sequence from cotton event MON15985 can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such sequences from the event using primers derived from the sequences provided herein followed by standard DNA sequencing.

Detection Kit

As used herein, "detection kit" refers to a kit used to detect the presence or absence of DNA from a MON15985 event in a sample comprising nucleic-acid probes and primers of the present invention, which hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence, and other materials necessary to enable nucleic acid hybridization or amplification methods. Alternatively, a detection kit may comprise materials necessary to enable one skilled in the art to perform methods similar to those described in PCT International Application WO 97/22719, incorporated herein by reference, to detect the presence or absence of DNA from a MON15985 event in a sample.

Example 1

Cotton, *Gossypium hirsutum*, has been genetically modified to resist *Lepidopteran* pests, which have a negative impact on cotton production. This was accomplished as indicated herein by the insertion of a DNA cassette which encodes the insecticidal Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* into the genome of cotton cultivar Coker 312 through *Agrobacterium sp* transformation using a DNA fragment derived from plasmid PV-GHBK04 (pMON10518 in U.S. Patent No. 5,500,365). This transformation resulted in three separate insertions into the cotton genome. The primary, functional insert responsible for expressing the Cry1Ac protein in cotton event 531 comprises a promotor, *cry1Ac* coding region, and

termination sequence linked to a sequence which encodes an antibiotic selectable marker. A second insert adjacent to and immediately upstream of the first inserted sequence comprises a partial *cry1Ac* coding region and termination sequence. The third insert comprises only a partial termination sequence and has been shown to segregate independently from the first two sequences indicated above. The first and second inserted sequences are tightly linked and therefore do not segregate from each other. Cotton genome sequence flanks the 5' and 3' ends of all three inserts. Therefore, six unique cotton genome/insert junctions were created as a result of the transformation process.

Molecular analyses were performed on cotton event MON531 to define the ends of the transgene DNA insertions and identify the cotton genomic DNA flanking the transgene DNA inserts. Genome walking studies combined with nucleotide sequencing yielded the DNA sequences of four said cotton genome/insert junctions.

The complex arrangement of genetic elements, derived from the transformation plasmid PV-GHBK04 in cotton event MON531 provides novel nucleic acid sequences at the 5' and 3' cotton genome/insert junctions at each of three sites of insertions. These novel nucleic acid sequences are useful for detecting DNA from cotton event MON531 in a sample using various methods well known in the art. The following provides a nonlimiting example of how one might use these novel nucleic acid sequences to detect cotton event MON531 in a sample.

DNA Isolation for PCR™ Analyses.

DNA from cotton event MON531 was extracted from seed tissue. DNA was extracted from both seed and leaf tissues from the control substance (non-transgenic cotton seed and leaf tissue). DNA from seed was isolated by processing the seed to a fine powder using a commercially available blender. Approximately 2 g of the processed seed was transferred to a 50 ml conical tube, and ~16 ml of CTAB extraction buffer [1.5% (w:w) CTAB, 75 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 1.05 M NaCl, and 0.75% (w:w) PVP (MW 40,000)] was added to the processed seed. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing and then allowed to cool to room temperature. An equal volume (~16 ml) of room temperature chloroform:isoamyl alcohol (24:1 (v/v)) or chloroform was added to the samples. The suspension was mixed by

inversion, and the two phases separated by centrifugation at ~16,000 x *g* for 5 minutes. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipet and placed into a clean 50 ml conical tube. Approximately 1/10 volume (~1.6 ml) of 10% CTAB buffer [10% (w:w) CTAB and 0.7 M NaCl] was added to the aqueous phase, which was then mixed by inversion. The samples were centrifuged at ~16,000 x *g* for 5 minutes to separate the phases. The aqueous (upper) phase was removed, mixed with an equal volume (~15 ml) of CTAB precipitation buffer [1% (w:w) CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, and 10 mM EDTA pH 8.0] and allowed to stand at room temperature for approximately 1 hour. The samples were centrifuged at ~10,000 x *g* to pellet the DNA, the supernatant was decanted, and the pellet was dissolved in approximately 2 ml of high salt TE [10mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, and 1 M NaCl] by incubating at 37°C with gentle swirling for approximately 2 hours. Centrifugation was performed at ~23,000 x *g* to pellet any remaining impurities. The supernatant was removed, placed into a clean 15 ml tube, and approximately 1/10 volume (~150 µl) of 3M NaOAc, pH 5.2, and 2 volumes (~4 ml relative to the supernatant) of chilled 100% ethanol were added to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing approximately 1 ml of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 5 minutes, dried, and re-dissolved in TE, pH 8.0 in a 4°C refrigerator overnight.

The non-transgenic cotton genomic DNA used as a control was isolated from leaf tissue that was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue was transferred to a 13 ml centrifuge tube and 6 ml of extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM sorbitol, 100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.38% (w/v) sodium bisulfite), 2.5 ml nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB), and 1 ml Sarkosyl (5% (w/v) solution)] was added. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing. Four and a half milliliters of chloroform:isoamyl alcohol (24:1 (v/v)) at room temperature was added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated by centrifugation for 15 minutes at ~2,000 × *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipet and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube

containing 500 µl of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 2 minutes. The DNA was dried and dissolved in TE buffer in a 4°C refrigerator overnight.

PCR™ Verification of Unique Insert-Cotton Genome Junctions in Cotton Event MON531.

The DNA sequences of four cotton genome/insert junctions were identified using the PCR™-based Universal GenomeWalker Kit™ as per the manufacturer's protocol followed by nucleotide sequencing of the PCR™ products. Next, PCR™ assays were developed using one primer complementary to cotton genomic DNA and another primer complementary to inserted transgene DNA. For example, one primer designed to the 3' end of the primary, functional insert complementary to genomic flanking sequence (e.g., SEQ ID NO:6) paired with a second primer at the 3' end of the primary, functional insert complementary to inserted transgene sequence (e.g., SEQ ID NO:5). The PCR™ assays were performed using 10 - 100 ng of cotton event MON531 genomic DNA template in a 50 µl reaction volume containing a final concentration of 1.1 mM Mg^{2+}, 0.4 µM of each primer, 200 µM each dNTP, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase. The reactions for the PCR™ assays were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 38 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 90 seconds; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The PCR™ products were separated using agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining, excised from the gel, and subjected to DNA sequencing using dye-terminator chemistry to confirm the sequences.

In the example above, as expected, the control reactions without template DNA and Coker 312 non-transgenic negative control DNA did not generate a PCR™ product. The cotton event MON531 samples generated the expected size PCR™ products of 264 bp for the 3' flanking sequence. Therefore, the novel nucleic acid sequences at the junction of inserted DNA and cotton genomic DNA in cotton event MON531 are useful for detecting DNA derived from cotton event MON531 in a sample.

MON531 in the variety Coker 312 background was crossed into the variety DP50 (Delta & Pine Land Company) to produce a Delta&Pine Land Company variety containing the

MON531 event encoding the Cry1A protein. The subsequent variety was designated as DP50B.

EXAMPLE 2

This example describes the production of a recombinantly transformed cotton plant designated as MON15985 derived from DP50B which contains an additional insertion event encoding a Cry2Ab insect inhibitory protein, and the isolation and characterization of the 5' and 3' DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the MON15985 and segregant MON15985X insertion event.

Target DP50B plant cells were transformed using particle acceleration technology with a linear DNA segment derived from plasmid PV-GHBK11. The linear DNA segment was prepared by digestion of plasmid PV-GHBK11 with the restriction enzyme KpnI, separation of the plasmid fragments by agarose gel electrophoresis and isolation of the DNA segment containing cassette comprising the Cry2Ab coding sequence and UidA coding sequence (GUS). No plasmid backbone was contained within the segment or sequence isolated and purified and prepared for bombardment of cotton tissue. The expression cassette consists of a Cry2Ab coding region regulated by an enhanced CaMV35 S plant expressible promoter and an Agrobacterium tumefaciens NOS3' transcription termination and polyadenylation sequence. The Cry2Ab coding sequence is designed to target the expression product as a precursor protein for chloroplast import in plant cells (US Patent Application Serial NO. 09/186,002, filed November 4, 1998).

The cotton variety DP50B was transformed with the DNA cassette described above containing a sequence encoding a Cry2Ab insect inhibitory protein by bombardment with DNA coated gold particles using electrostatic discharge method (John, M.E., Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17:185-208 (1997)). Different events were screened for efficacy against insect pests, phenotype, and genetic segregation for expression of the Cry2Ab protein. Based on these criteria, 6 lines were chosen for further characterization of the insertion event. Southern blot was used as the primary method for evaluating the presence of one or more copy numbers of insertion and completeness of the insertion event. One line, 15985, was chosen for a thorough molecular

characterization of the insertion event that inserted into the DP50B genome. The DNA surrounding the insertion event was isolated and characterized.

Isolation of the DNA flanking the insertion event: DNA was extracted from young cotton leaves by a modified Phyto- Pure® method from Amersham which is designed to extract DNA from plants with large amounts of contaminating carbohydrates. In order to determine the sequence of the DNA around the inserted Cry2Ab coding sequence, the Genome Walker® protocol from CloneTech, Inc. was used. The manufacturer's recommended conditions were followed with only one modification: rather than using phenol extraction for purification of the DNA after restriction endonuclease cleavage, the DNA was purified with a Qiagen QIAquick® spin column in accordance with the manufacturer's instruction manual.

The enzymes used to cut the genomic DNA prior to linker ligation were *Dra*I, *Pvu*II, *Sca*I and *Stu*I. Following the procedure provided by Qiagen, the DNA was extracted in 5 volumes of PB buffer, bound to the column, washed with 0.75ml of PE and then eluted from the column into 20mL of 10mM Tris pH 8.5. This DNA was then used as the source for the linker libraries. Primer positions were deliberately chosen away from the ends of where the DNA was linearized to allow for a certain amount of deletion at either end. The first primers (SEQ ID NO:30 [gactgaatgc ccacaggccg tcgagtt] and SEQ ID NO:31 [cctgaactct ggcacccagt tcgacc]) were designed to anneal to sequences that are unique to a Cry2Ab coding sequence because of the presence of repeated DNA elements in the cotton genome. The resulting PCR™ products were subjected to a second PCR™ reaction using nested primers directly adjacent to those used in the first reaction (SEQ ID NO:32 [ggtttctaca ggacggacca tggagatctg c] and SEQ ID NO:33 [ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag g]). The PCR™ parameters used were those recommended by CloneTech. The primary amplification parameters were as follows: 7 cycles 94°C 2 sec, 72°C 3min, 32 cycles 94°C 2 sec, 68°C 3 min, and secondary amplification parameters were as follows: 5 cycles 94°C 2 sec, 72°C 3 min, 20 cycles 94°C 2sec, 68°C 3 min, and 68°C 4 min in last cycle. All PCR™ reactions were performed on a Perkin-Elmer 9700 machine.

The resulting PCR™ products from the second amplification were cloned into the pBS(SK+) vector from Stratagene which had been cut with *Sma*I to generate a blunt end and treated with alkaline phosphatase to prevent self-ligation. The DNA fragments that were

generated in the secondary PCR™ reaction were treated with T4 DNA kinase to add a 5'phosphate and then ligated into the blunt end vector under standard ligation conditions.

Genome Walker® protocol: The secondary PCR™ reactions using the nested primer pairs produced multiple fragments synthesized from both 5' and 3' ends. Three independent fragments for the 5' end were cloned and sequenced using methods well-known in the art, while two fragments were cloned and sequenced from the 3' end. For each individual fragment, at least two independent clones were obtained.

The sequence of the clones from each primer set were compared to one another. The sequences among the respective clones were determined to be the same, and contained the same plant trans-gene junction.

EXAMPLE 3

This example illustrates how the DNA sequences flanking the MON15985 and MON15985X insertion event can be used to determine zygosity.

Design and development of a PCR™ based test for homozygosity of the MON15985 insertion event: The DNA sequence of the two regions flanking the MON15985 insertion event was used to design a PCR™ based homozygosity test. Such a test would be considered useful if it were able to detect both the specific MON15985 insertion event and the wildtype chromosome. To test the feasibility of developing an assay that also detects the wild type chromosome, primers were designed from the sequence directly adjacent to the insertion event to test if they could be used to synthesize a DNA fragment in the non-transgenic cotton, as well as in the 15895 line. The primers chosen were capable of synthesizing the whole MON15985 insertion event, but no product was observed in the non-transgenic controls. These results indicated that the insertion event was not a simple break in the DNA and insertion of the DNA sequence and cassette encoding Cry2Ab. This result, however, established that the two ends are indeed connected and flank an intact gene cassette encoding Cry2Ab.

Primers were designed to the nucleic acid sequence flanking the 3' end of the insert to amplify fragments via the Genome Walker® protocol in linker libraries made from non-transgenic cotton DNA. A 620 base pair fragment was cloned and sequenced from non-transgenic cotton. This sequence was then used to design primers for the wild type

chromosome that would be present in the heterozygous individual. Several sets of primers were made and tested together in order to find a set that worked in a single reaction and provided no background bands. A primer set comprising SEQ ID NO:34 ([tggttgcttc tgaggctac]3' cotton plant flanking sequence) and SEQ ID NO:35 ([cttgtcattg gtgcagacag gttc]5' cotton plant flanking sequence) was found to produce an 800 base pair amplicon from wild type, or non-transgenic cotton DNA. However, if at least one insert is present, the primer comprising SEQ ID NO:36 will anneal to cry2Ab specific sequences and generate a 1.5 kb amplicon with a primer annealing to the 3' cotton plant flanking sequence (SEQ ID NO:34). Therefore, the resulting assay using PCR™ primers comprising SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:34, and SEQ ID NO:35 is as follows: if an individual is homozygous for the MON15985 insertion event then only one band of 1.5 kb would be present; but if it is heterozygous then an additional 0.8 kb band would also be present.

Both of these bands (1.5 kb and 0.8 kb) were cloned and sequenced to confirm their identity. The DNA sequence of the 800 base pair fragment generated in heterozygous individuals is identical to the sequence of the Genome Walker® fragment generated with the primers from the 3' end and non-transgenic DNA.

Confirmation of PCR™ based zygosity assay: To verify the precision of the zygosity assay a series of experiments were conducted utilizing known homozygous, heterozygous and negative transgenic progeny of MON15985.

R2:

Phenotype: Fifteen individual R2 plants from three suspected R1 genotypes were characterized for the presence or absence of the Cry2Ab protein via ELISA. Plants of interest that were positive for the study included MON15985-2 and MON15985-34. Plant MON15985-71 was identified as negative for Cry2Ab.

R3:

Phenotype: Fifteen individual R3 seeds from each of the selected R2 plants were planted in 4" pots and subsequently screened for the presence of the Cry2Ab protein via qualitative ELISA. The ELISA results reported that all R3 plants of MON15985-2 were positive, thus giving the R2 parent a designation of being homozygous for the cry2Ab gene. R3 progeny of MON15985-34 were a mixture of positive and negative

plants giving the R2 parent a designation of being heterozygous for the *cry2Ab* gene. All R3 plants of MON15985-71 were negative and confirmed that the R2 parent was negative as well.

Genotype: A PCR™-based zygosity assay was performed on five R3 plants of MON15985-2 and MON15985-71. Primers and techniques were used as previously described. Results of this test gave the expected banding patterns. All progeny of MON15985-2 produced only the single 1.5 kb band supporting the ELISA data, which indicated the MON15985-2 line is homozygous positive for the *cry2Ab* gene. All progeny of MON15985-71 produced only the single 0.8 kb band found in the wild-type, thus supporting the ELISA results in demonstrating that this line is homozygous negative for the cry2Ab gene. Five progeny of each of fourteen individual R2 families of MON15985-34 were screened as well giving combinations of homozygous, heterozygous and negative plants.

R4:

Five individual plants from all three R3 populations were allowed to self pollinate and were taken to harvest. Fifteen R4 progeny from each of the R3 plants tested via PCR™ were planted in 4" pots to confirm the results on the R3 plants. Thus, if the R3 PCR™ result was homozygous then the all the R4 progeny should be homozygous, as well if the R3 PCR™ result was heterozygous the R4 progeny should be a mixture of homozygous, heterozygous and negative plants. All R4 progeny families provided the expected result based on the R3 PCR™ assay. Therefore, the PCR™ based assay provides a durable method for genotyping plants for zygosity.

EXAMPLE 4

This example illustrates the DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert in cotton event MON15985 and MON15985X.

DNA from MON15985 was extracted from leaf tissue that was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue was transferred to a 13 ml centrifuge tube and 6 ml of extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM sorbitol, 100 mM Tris pH

7.5, 5 mM EDTA, 0.38% (w/v) sodium bisulfite), 2.5 ml nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB), and 1 ml Sarkosyl [5% (w/v) solution)] were added. The samples were incubated at 65°C for approximately 35 minutes. Four and a half milliliters of chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] at room temperature were added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated by centrifugation for 15 minutes at ~2,000 × *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing 500 µl of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 2 minutes. The DNA was dried and dissolved in TE buffer in a 4°C refrigerator overnight.

DNA from the DP50 control was extracted from seed tissue. DNA from seed was isolated by processing the seed to a fine powder using a commercially available blender. Approximately 2 g of the processed seed was transferred to a 50 ml conical tube, and ~16 ml of CTAB extraction buffer [1.5% (w/v) CTAB, 75 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 1.05 M NaCl, and 0.75% (w/v) PVP (MW 40,000)] were added to the processed seed. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing and then allowed to cool to room temperature. An equal volume (~15 ml) of room temperature chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] was added to the samples. The suspension was mixed for 5 minutes, and the two phases separated by centrifugation at ~16,000 x *g* for 5 minutes at room temperature. The aqueous (top) layer was removed and placed into a clean 50 ml conical tube. Approximately 1/10 volume (~1.5 ml) of 10% CTAB buffer [10% (w/v) CTAB and 0.7 M NaCl] and an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol [24:1 (v/v)] were added to the aqueous phase, which was then mixed by inversion for 5 minutes. The samples were centrifuged at ~16,000 x *g* for 5 minutes at room temperature to separate the phases. The aqueous (upper) phase was removed, mixed with an equal volume (~15 ml) of CTAB precipitation buffer [1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, and 10 mM EDTA pH 8.0] and allowed to stand at room

temperature for approximately 1 hour. The samples were centrifuged at ~10,000 x *g* to pellet the DNA, the supernatant was decanted, and the pellet was dissolved in approximately 2 ml of high salt TE [10mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, and 1 M NaCl] by incubating at 37°C with gentle swirling for approximately 2 hours or by sitting in a 4°C refrigerator overnight. Centrifugation was performed at ~23,000 x *g* to pellet any remaining impurities. The supernatant was removed, placed into a clean 15 ml tube, and approximately 1/10 volume (~150 µl) of 3M NaOAc, pH 5.2, and 2 volumes (~4 ml relative to the supernatant) of 100% ethanol were added to precipitate the DNA. The precipitated DNA was spooled into a microfuge tube containing approximately 1 ml of 70% ethanol. The DNA was pelleted in a microfuge at maximum speed (14,000 rpm) for 5 minutes, dried, and re-dissolved in TE, pH 8.0 in a 4°C refrigerator overnight.

The DP50 and MON15985 DNA were quantitated prior to the initiation of the study within the study from which they were derived. DNA quantitation was conducted using a Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer using Boehringer Mannheim molecular size marker IX as a DNA calibration standard.

PCR analysis of the genomic sequence flanking the 5' end of the insert encoding Cry2Ab in cotton event MON15985 was performed using one primer derived from the 5' genomic flanking sequence paired with a second primer located in the inserted DNA near the 5' end in the enhanced CaMV 35S promoter sequence, spanning a 1894 bp region (SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27). The PCR analysis for the genomic sequence flanking the 3' end of the insert encoding Cry2Ab in cotton event MON15985 was conducted using one primer located in the NOS 3' polyadenylation sequence near the 3' end of the insert paired with a second primer derived from the 3' genomic flanking sequence, spanning a 763 bp region (SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29).

The PCR analyses were conducted using genomic DNA from the cotton event MON15985 or non-transgenic cotton line DP50. The PCR analysis was conducted using 35-50 ng of cotton event MON15985 or non-transgenic line DP50 genomic DNA template in a 50 µl reaction volume containing a final concentration of 1.5 mM Mg^{2+}, 0.2 µM of each primer, 200 µM each dNTP, and 2.5 units of Platinum *Taq*

DNA polymerase (Gibco BRL). The reactions for the 5' end of the insert were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 35 cycles of 94°C for 1 minute, 56°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The reactions for the 3' end of the insert were performed under the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 35 cycles of 94°C for 1 minute, 53°C for 1 minute, 72°C for 45 seconds; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The PCR products were separated on a 1.0 % agarose gel. Electrophoresis was conducted for approximately 1.5-2 hours at 100 V and visualized by ethidium bromide staining.

PCR products of the expected sizes containing the sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert encoding Cry2Ab in cotton event MON15985 generated with two primer pairs were isolated by gel electrophoresis of 20 µl of the PCR products on 1.0% agarose gels. PCR products representing the 5' or 3' flanking sequences were excised from a gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) following the procedure supplied by the manufacturer. For both analyses, the purified PCR products were then sequenced with the PCR primers using dye-terminator chemistry by the Monsanto Company Genomics Sequencing Center. Due to the length of the PCR products, sequencing was performed with both the primers used to generate the products as well as primers designed internal to the amplified sequence.

PCR analyses were performed on genomic DNA extracted from cotton event MON15985 and non-transgenic cotton line DP50 to verify the DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert in cotton event MON15985. The control reaction containing no template DNA as well as the reaction containing DP50 non-transgenic cotton DNA did not generate a PCR product, as expected. PCR analysis of the cotton event MON15985 DNA generated the expected size product of 1894 bp representing the 5' flanking sequence and a portion of the 5' end of the insert encoding Cry2Ab.

The control reaction containing no template DNA as well as the reaction containing DP50 non-transgenic cotton DNA did not generate a PCR product, as expected. PCR analysis of the cotton event MON15985 DNA generated the expected size product of 763 bp representing the 3' flanking sequence and a portion of the 3' end of the insert. These results demonstrate that a predicted size PCR product is

generated from both ends of the insert encoding Cry2Ab in the cotton event MON15985.

The consensus sequence representing the cotton genomic DNA sequence flanking the 5' end of the insert, as well as the DNA at the 5' end of the insert, is represented by SEQ ID NO:11. The 5' consensus sequence data contains 1877 bp of DNA flanking the insert followed by 390 bp of insert sequence containing the enhanced CaMV 35S promoter. Base pairs 362-750 show homology to chloroplast DNA. The consensus sequence representing the cotton genomic sequence flanking the 3' end of the insert, as well as the DNA at the 3' end of the insert, is represented in SEQ ID NO:12. The 3' consensus sequence data contains 349 bp of insert sequence containing the 3' end of the NOS 3' polyadenylation sequence and polylinker sequence followed by 1012 bp of cotton genomic DNA flanking the insert. The reported 5' and 3' consensus sequences presented here are the combination of multiple sequencing reactions and are shorter than those of the PCR products used to generate the sequences. These data delineate the 5' and 3' ends of the insert in the cotton event MON15985 and show the DNA which immediately flanks the insert on both ends.

This data demonstrates that cotton event MON15985 contains a single DNA insert containing (1) a sequence encoding UidA (GUS) regulated by the enhanced 35S CaMV promoter (lacking approximately 260 bp at the 5'end) and NOS 3' polyadenylation sequence; and (2) a coding sequence encoding Cry2Ab regulated by the enhanced 35S CaMV promoter and the NOS 3' polyadenylation sequence (Figure 1). PCR and sequence analyses performed in this example confirm the sequence of the 5' and 3' ends of the insert encoding Cry2Ab in the cotton event MON15985, and verify the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the insert.

EXAMPLE 5

This example illustrates the physical characteristics of the sequences flanking the cotton event MON15985, and characterizes the nature and physical location of additional DNA sequences flanking the 5' and 3' end of the inserted DNA in the cotton event MON15985. Genomic DNA was analyzed by Southern blotting to determine

the number of insertion events, the copy number of the inserted DNA, the integrity of the inserted promoters, coding regions, and polyadenylation sequences, and the presence or absence of plasmid backbone sequence. All analyses were performed with both the cotton line DP50B (control) and with the newly produced MON15985 event to characterize the newly inserted DNA. In addition, the flanking sequence of the 5' and 3' "insert-to-plant" junctions (previously determined by Genome Walking) were confirmed by PCR.

Plasmid PV-GHBK11, the source plasmid, served as the primary reference substance in these analyses. The plasmid, mixed with DNA from the DP50 control substance, was used as a size indicator and a positive hybridization control in Southern blot analysis. Additionally, molecular size markers from Boehringer Mannheim [Molecular Weight Markers II (23.1 Kb-0.6 Kb) and IX (1.4 Kb-0.072 Kb), catalog #236 250 and #1449 460, respectively] and Gibco BRL [High Molecular Weight DNA Marker (48.5 Kb-8.3 Kb) and 100 bp ladder (2.1 Kb-0.1Kb), catalog #15618-010 and #15628-019, respectively] were used for size estimations.

Genomic DNA from insect protected cotton event MON15985 was digested with a variety of restriction enzymes and subjected to Southern blot hybridization analysis to characterize the DNA encoding Cry2Ab2 and GUS integrated into the genome of DP50B.

DNA extracted from leaf tissue was used for all of the analyses in this example except for the nontransgenic sample on the *uidA* gene cassette intactness blot probed with the NOS 3' polyadenylation sequence probe which was isolated according to the method of Rogers and Bendich (1985). Leaf tissue was frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder using a mortar and pestle. Approximately 1 g of the ground leaf tissue was transferred to 13 ml centrifuge tube containing 6 ml of the extraction buffer [2.5 ml DNA extraction buffer (350 mM Sorbitol, 100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA), 2.5 ml Nuclei lysis buffer (200 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB), and 1 ml Sarkosyl (5% solution)]. The samples were incubated at 65°C for approximately 30 minutes with intermittent mixing. Four and a half milliliters of a mixture of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) at room temperature was added to the samples. The suspension was mixed for 2 to 3 minutes, and the two phases separated

by centrifugation for 15 minutes at ~1,000 x *g* at 4°C. The aqueous (top) layer was removed using a transfer pipet and placed into a 13 ml centrifuge tube. Five milliliters of 100% isopropanol were added, and the tubes were mixed by inversion to precipitate the DNA. The precipitated DNA was pelleted by centrifuging at ~1,000 x *g* for 5 minutes at 4°C. The pellet was washed with approximately 1 ml of 70% ethanol and centrifuged for an additional 5 minutes at ~1,000 x *g* at 4°C . The DNA was allowed to dry at room temperature and re-dissolved in TE at 4°C overnight.

The purified genomic DNA was quantitated using a Hoefer DyNA Quant™ 200 Fluorometer (San Francisco, CA) with Boehringer Mannheim Molecular Weight Marker IX used as a calibration standard.

Approximately 10 µg of genomic DNA from the test and control lines were used for the restriction enzyme digests. Overnight digests were performed at 37°C according to manufacturers protocols in a total volume of 500 µl using 100 units of restriction enzyme. Some of the control digests were spiked with either 5 or 10 pg of PV-GHBK11. All restriction enzymes were purchased from Boehringer Mannheim. After digestion, the samples were precipitated by adding 1/10 volume (~50 µl) of 3M NaOAc and 2 volumes (~1 ml relative to the original digest volume) of 100% ethanol, followed by incubation at -20°C for at least one hour. The digested DNA was pelleted by centrifugation, washed with 70% ethanol, vacuum dried for 10-20 minutes, and re-dissolved at room temperature in either water or TE.

Digested DNA's were separated on 0.8% agarose gels in 1X TBE buffer. A 'long run' and a 'short run' were performed for each Southern blot analysis. The long run facilitated greater resolution of the higher molecular weight DNAs while the short run ensured that all smaller molecular weight DNAs were retained on the gel. The long run/short run involved a 4-6 hour electrophoresis at 80-85 V and an overnight (9-15 hour) run at 35-38 V. After electrophoresis, the gels were stained in 0.5 µg/ml ethidium bromide for 20-30 minutes and photographed.

Plasmid PV-GHBK11 DNA was isolated from overnight *E. coli* cultures. Probe templates homologous to the *cry2Ab* coding region, *uidA* coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, the NOS 3' polyadenylation sequence, and the entire backbone region were prepared by PCR using PV-GHBK11 as the template.

Approximately 25 ng of each probe template, except the NOS 3' polyadenylation sequence, were labeled with ^{32}P-dCTP using the random priming method (RadPrime DNA Labeling System, Life Technologies). The NOS 3' polyadenylation sequence was labeled using PCR with NOS 3' template (15 ng), NOS 3' specific primers (0.25 µM each), 1.5 mM $MgCl_2$, 3 µM dATP, dGTP, and dTTP, 100 µCi of ^{32}P-dCTP and 2.5 Units of *Taq* DNA polymerase in a final volume of 20 µl. The cycling conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 3 minutes; 5 cycles at 94°C for 45 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute; 1 cycle at 72°C for 10 minutes. The radiolabeled probe was purified using a Sephadex G-50 column (Boehringer Mannheim).

Southern blot analyses (Southern, 1975) were performed established procedures, generally Maniatis Fritsch Sambrook (Cold Spring Harbor). Following electrophoresis, the gel was incubated in depurination solution (0.125 N HCl) for ~ 10 minutes followed by denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) for ~30 minutes, and then neutralizing solution (0.5 M Tris-HCl pH 7, 1.5 M NaCl) for ~30 minutes. The DNA from the agarose gels was transferred to Hybond-N™ nylon membranes (Amersham) using a Turboblotter™ (Schleicher & Schuell). The DNA was allowed to transfer for 4 hours to overnight (in 20X SSC) and covalently cross-linked to the membrane with a UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) set to autocrosslink. The blots were prehybridized an average of 2 hours in an aqueous solution of 0.5 M sodium phosphate, 7% SDS (w/v), and 0.1 mg/ml *E. coli* tRNA. Hybridization with the radiolabeled probe was performed in fresh prehybridization solution for 14-21 hours at approximately 65°C. Membranes were washed at least four times in an aqueous solution of 0.1% (w/v) SDS and 0.1X SSC for 15 minute intervals at 65°C. Multiple exposures of the blots were generated using Kodak Biomax MS™ film in conjunction with one Kodak Biomax MS™ intensifying screen. Blots were stripped by incubating the blot with boiling 0.1% (w/v) SDS and allowing it to cool to room temperature.

The insert number (the number of integration sites of newly introduced transgenic DNA in the cotton genome) was evaluated. The test and control DNAs were digested with the restriction enzyme *Sca*I, which does not cleave within the

DNA segment used for transformation. This enzyme released a segment containing the inserted DNA and adjacent plant genomic DNA. The plasmid-spiked DP50 'short run' samples were also digested with *Xba*I to linearize the plasmid. The blot was probed with the reference plasmid PV-GHBK11.

The number of copies of the transformation cassette inserted into each locus was determined by digesting the test genomic DNA with the restriction enzyme *Sph*I, an enzyme that cuts only once in the linear DNA segment used to generate the event. The blot was probed with the reference plasmid PV-GHBK11.

The integrity of the Cry2Ab coding region was determined by digestion with a restriction enzyme, *Nco*I, that cleaves at the 5' and 3' ends of the Cry2Ab coding region. The blot was probed with the full length Cry2Ab coding region.

The integrity of the Cry2Ab encoding cassette (enhanced CaMV 35S promoter, Cry2Ab coding region, and NOS 3' polyadenylation sequence) was assessed by digestion with the restriction enzyme *Bam*HI which cleaves at the 5' and 3' ends of the Cry2Ab cassette. The blot was sequentially probed with each element of the cassette.

The integrity of the UidA coding region was determined by digestion with the restriction enzymes *Eco*RI and *Bgl*II which cleave at the 5' and 3' ends of the UidA coding region, respectively. The blot was probed with the full length UidA coding region.

The integrity of the UidA cassette (enhanced CaMV 35S promoter, UidA coding region, and NOS 3' polyadenylation sequence) was assessed by digestion with the restriction enzymes *Bam*HI and *Sph*I which cleave at the 5' and 3' ends of the UidA cassette. The blot was sequentially probed with each element of the cassette.

The backbone region of the plasmid is defined as the *Kpn*I restriction fragment of PV-GHBK11 that was not used to transform the plant. It consists of a bacterial origin of replication, ori-pUC, and the *nptII* gene under the control of a bacterial promoter. To confirm the absence of backbone, genomic DNA was digested with the restriction enzyme *Kpn*I and probed with the full-length backbone region.

The sequence of the 5' and 3' insert-to-plant genomic DNA junctions were determined as described above using Clontech's Universal Genome Walker™ Kit.

Primers were designed to verify these junctions by PCR. The 5' junction was verified using one primer designed to the 5' genomic flanking sequence paired with a second primer in the enhanced CaMV 35S promoter of the *uidA* gene. The 3' junction was verified using a primer designed to the 3' genomic flanking sequence with a second primer located in the *cry2Ab* gene. The PCRs were conducted using 100 ng of leaf genomic DNA (1-2 µl) as a template, 10 pmol of each primer (1 µl each), and PCR Supermix (Gibco BRL cat no. 10572-014) in a 25 µl reaction volume. The amplification of the reactions was performed under the following cycling conditions: 1 cycle 94°C for 3 minutes; 30 cycles 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; 1 cycle 72°C for 4 minutes. The PCR products were separated on a 1% agarose gel in 1X TAE and visualized by staining with ethidium bromide.

Test and control DNA samples were digested with *Sca*I. DP50 control DNA spiked with PV-GHBK11 was also digested with *Sca*I. Since *Sca*I does not cleave within the plasmid, a second enzyme, *Xba*I, was added to linearize the plasmid. The plasmid was linearized to facilitate its migration through the gel to serve as an accurate size estimator. The blot was probed with radiolabeled PV-GHBK11 (Figure 1), the source plasmid for the linear DNA segment used in the transformation. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size band at approximately 8.7 Kb, the size of the whole plasmid, with no additional bands. The DP50B long and short runs produced two bands at approximately 22 Kb and 15 Kb (very faint). Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B (MON531) control they are considered background bands associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short each produced one band not present in either the DP50 or the DP50B lanes at approximately 9.3 Kb. This result suggests that cotton event MON15985 contains one segment of integrated DNA located on a 9.3 Kb *Sca*I restriction fragment.

Genomic DNA isolated from MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Sph*I. The blot was probed with PV-GHBK11, the source plasmid for the linear DNA segment used in transformation. The DP50 long run did not produce any detectable

background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected size bands at 3.9 and 4.8 Kb; an additional faint band at 8.7 Kb in lane 5 is presumably due to undigested plasmid DNA. The DP50B long and short runs produced three bands at approximately 6.4, 8.3, and 8.6 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs each produced two bands not present in the DP50 or the DP50B lanes at approximately 2.3 Kb and 3.5 Kb. Because the enzyme *Sph*I cuts only once within the transformation cassette, this result suggests that MON15985 contains one copy of integrated DNA which produces these two restriction fragments.

DNA from the test, controls, and control mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Nco*I to release the Cry2Ab coding region and assess its intactness. The blot was probed with the full-length Cry2Ab coding region. As expected, the DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected ~1.9 Kb band which corresponds to the entire Cry2Ab coding region. Both the MON15985 long and short runs also produced a 1.9 Kb band which corresponds to the expected size of an intact Cry2Ab coding region. This result establishes that event MON15985 contains the intact Cry2Ab coding region, with no additional detectable fragments.

DNA from the test, controls, and control mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Bam*HI which releases the entire cassette encoding Cry2Ab (i.e. Cry2Ab coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, and the NOS 3' polyadenylation sequence).

The blot was probed with the full length Cry2Ab coding region. The DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected 3.2 Kb band which corresponds to the entire cassette encoding Cry2Ab. Both the MON15985 long and short runs produced a band at approximately 4.0 Kb. This result indicates that the 3' end of the transformation cassette lost the *Bam*HI restriction site during integration into the cotton genome. The

3' sequence of the insert-to-plant junction, previously determined by genome walking, was verified by PCR analysis. Sixty-six base pairs of the 3' end of the transformation cassette were shown to have been deleted, including the *Bam*HI site. The deleted nucleotides do not include any of the NOS 3' polyadenylation sequence associated with the cassette encoding Cry2Ab, but only linker DNA. These results establish that the cassette encoding Cry2Ab is intact. No partial cassettes derived from that encoding Cry2Ab were detected.

The blot used above was stripped and re-probed with the full length enhanced CaMV 35S promoter. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 in the short run produced the expected size bands at 5.5 and 3.2 Kb with no additional bands detectable. The DP50B long and short runs produced five bands at approximately 4.4, 5.3, 7.5, 9.4, and 22 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs both produced one band at approximately 4.0 Kb which is not present in either the DP50 or the DP50B lanes. This corresponds to the fragment predicted for the cassette encoding Cry2Ab given the result obtained with the Cry2Ab coding region probe. A second band in the MON15985 lanes resulting from hybridization to the enhanced CaMV 35S promoter associated with the cassette encoding UidA (GUS) is predicted but not apparent in the test lanes. The results of the NOS 3' polyadenylation sequence probe, discussed below, demonstrate that the enhanced CaMV 35S promoter sequence associated with the UidA encoding cassette is present, but the 4.4 Kb band co-migrates with a 4.4 Kb background band and is not apparent. No extraneous promoters were detected.

The blot used above was re-stripped and re-probed with the full length NOS 3' polyadenylation sequence. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 5.5 and 3.2 Kb with no additional bands detectable. The DP50B long and short runs produced one band at approximately 1.2 Kb. Since this band is present in both event MON15985 and the DP50B control it is considered background associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs

each produced two bands which are not present in the DP50 or the DP50B lanes at approximately 4.0 and 4.4 Kb. The 4.0 Kb band corresponds to the fragment predicted for the cassette encoding Cry2Ab, given the result from above. The 4.4 Kb band was not apparent on the blot probed with the enhanced CaMV 35S promoter because it co-migrates with the 4.4 Kb background band seen on that blot. This segment is associated with the *uidA* cassette.

These results establish that the Cry2Ab encoding cassette is intact and that there is a 66 bp deletion between the *Bam*HI site and the 3' end of the transformation cassette, which does not include any of the NOS 3' polyadenylation sequence at the 3' end of the cassette encoding Cry2Ab. No partial cassettes derived from that encoding Cry2Ab were detected.

Genomic DNA isolated from MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Eco*RI and *Bgl*II to release the entire *uidA* coding region. The blot was probed with the full-length *uidA* coding region. The DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected ~1.9 Kb band which corresponds to the entire *uidA* coding region. Both the long and short runs of event MON15985 DNA also produced a 1.9 Kb band which corresponds to the expected size of an intact *uidA* coding region. This result establishes that event MON15985 contains the intact *uidA* coding region, with no additional fragments detected.

DNA from the test and control substances was digested with *Bam*HI and *Sph*I to release the entire *uidA* cassette (i.e. *uidA* coding region, the enhanced CaMV 35S promoter, and the NOS 3' polyadenylation sequence). The plasmid PV-GHBK11 was digested with *Pst*I and spiked into the DP50 short run samples after digestion (except for the NOS 3' polyadenylation sequence probe blot in which the plasmid was digested with *Bam*HI and *Sph*I). This was done to show the size of an intact full-length *uidA* cassette.

The blot was probed with the full length *uidA* coding region. As expected, the DP50 non-transgenic control long run and the DP50B control long and short runs

showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected 2.8 Kb band which corresponds to the entire *uidA* cassette. Both the MON15985 long and short runs produced an approximately 2.5 Kb band. This result indicates that a portion of the *uidA* cassette was not present. The 5' insert-to-plant junction, previously determined by genome walking, was verified by PCR analysis. It had been demonstrated previously that 284 bp of the 5' portion of the transformation cassette were deleted. These results establish that the *uidA* cassette is missing approximately 260 bp of the 5' promoter sequence and 24 bp of polylinker DNA derived from the multiple cloning site of the plasmid. Odell et al. (1985) showed that such a deletion should not affect accurate transcription initiation. No additional partial *uidA* cassettes were detected with the *uidA* coding region probe.

The blot used above was stripped and re-probed with the full length enhanced CaMV 35S promoter. The DP50 long run did not produce any background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 1.5 and 2.8 Kb with no additional bands detected. The DP50B long and short runs produced five bands at approximately 4.3, 4.6, 5.0, 6.6, and 8.5 Kb. Since these bands are present in both event MON15985 and the DP50B control they are considered background bands associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs each produced two bands at approximately 2.5 and 1.0 Kb not present in the DP50 or the DP50B lanes. The 2.5 Kb band corresponds to the fragment predicted for the *uidA* cassette. The 1.0 Kb band results from the enhanced CaMV 35S promoter associated with the cassette encoding Cry2Ab. No extraneous promoters were detected.

The blot was probed with the full length NOS 3' polyadenylation sequence. The DP50 long run did not produce any detectable background bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 short run produced the expected size bands at 3.8 and 2.2 Kb with no additional bands detected. The DP50B long and short run produced one band at approximately 1.2 Kb. Since this band is present in both event 15985 and the DP50B control it is considered background associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs each produced two bands not present in the DP50 or the DP50B lanes at approximately 2.5 and 2.3 Kb. The 2.5 Kb band corresponds to

the fragment predicted for the *uidA* cassette. The 2.3 Kb band results from NOS 3' polyadenylation sequence associated with the cassette encoding Cry2Ab.

These results confirm that the *uidA* cassette is missing approximately 260 bp of the 5' end of the enhanced CaMV 35S promoter but is otherwise intact.

Genomic DNA isolated from event MON15985, DP50B, DP50 (non-transgenic control) and DP50 mixed with plasmid PV-GHBK11 DNA was digested with *Kpn*I. The blot was probed with the entire backbone sequence. The DP50 long run showed no detectable hybridization bands. Plasmid PV-GHBK11 mixed with DP50 DNA produced one band at the expected size of 2.6 Kb for the entire backbone. The DP50B long and short run produced a single band at approximately 22 Kb. Since this band is present in both event MON15985 and the DP50B control it is considered background associated with the *cry1Ac* event. The MON15985 long and short runs contained the 22 Kb background band with no additional hybridization. This result establishes that event MON15985 does not contain any detectable plasmid backbone sequence.

PCR was performed on genomic DNA to confirm the insert-to-plant junction sequences at the 5' and 3' ends of the MON15985 insert. As expected, the non-transgenic samples did not yield a PCR product when either the 5' or 3' primer set was used. The DP50B sample (*cry1Ac* control event) did not yield products with either primer pair, as expected. A different event selected for expression of Cry2Ab, MON15813, also did not yield products when either primer set was used. The MON15985 genomic DNA yielded the correct size products when 5' end using primer pairs and 3' end primer pairs. This PCR analysis confirmed the 5' and 3' border sequences of MON15985.

The insect protected cotton event MON15985 was produced by particle acceleration technology using a *Kpn*I DNA segment containing a cassette encoding Cry2Ab and UidA. The MON15985 event contains a single DNA insert located on a 9.3 Kb *Sca*I fragment. This insert contains one complete copy of the inserted cassette which is missing approximately 260 bp at the 5'end of the enhanced CaMV 35S promoter driving expression of the UidA coding sequence. PCR was used to verify the 5' and 3' junction sequences of the insert with the plant genome, as well as the

intactness of the 5' and 3' ends of the insert. Event MON15985 does not contain any detectable plasmid backbone sequence resulting from the transformation event. Based on the enzymes used in this study, the restriction pattern of the *cry1Ac* insert is not changed by the insertion of the DNA inserted comprising the Cry2Ab coding sequence.

Thus, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18 and sequences comprising these sequences, are diagnostic for the insertion which gave rise to cotton event MON15985.

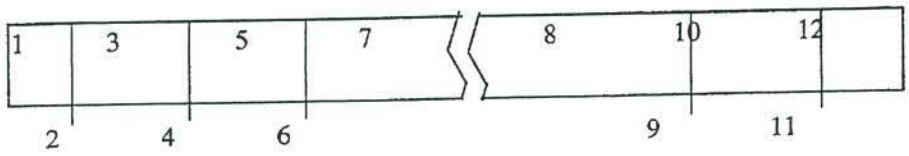
What is claimed is:

1. **An insect resistant cotton plant, or parts thereof, seed of said cotton plant having been deposited with the American Type Culture Collection under accession number PTA-2516.**

ABSTRACT

The present invention provides cotton plants, cotton tissues, and cotton seeds that include the MON15985 event, which confers resistance to *Lepidopteran* insect damage. Also provided are assays for detecting the presence of the MON15985 event based on the DNA sequence of the recombinant construct inserted into the cotton genome that resulted in the MON15985 event and of genomic sequences flanking the insertion site.

Figure 1



SEQUENCE LISTING

<110> Monsanto Technology LLC Huber, Scott Roberts, James Shappley, Zacchary

<120> Cotton Event 15985 and Compositions and Methods for Detection Thereof
<130> 38-21(52211)
<140> June 11, 2001
<160> 36
<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> sequence comprising a junction between insert DNA and cotton chromosome
<400> 1
gcgtttctgg ttataatata 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> sequence comprising a junction between insert DNA and cotton chromosome
<400> 2
cttctctgct aagtgggtca 20

<210> 3
<211> 1104
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1104)
<223> completely synthetic sequence
<400> 3
agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca 60

tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt 120

actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg 180

taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg 240

ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca 300

ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa 360

cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac 420

acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg 480

taggcacctc cgtactcttc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540

ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600

tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660

tagcctctac ctggacagac tctaacctct tgggacactt cagcttccca ctcaggcaca 720

accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 780

cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 840

aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 900

acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 960

atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 1020

tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1080

ttgtccctcc acttcttctc tgct 1104

<210> 4

<211> 309
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 4
aagtgggtca gtggggtggc attggttttt aatttcaacg cgttttgtcg catatacttt 60

tatgattggg gtttctcttt ggtgtacatc aatgaccttc cctattgcat tgtctgaatt 120

ttcatctctt aaatcggcta aaaaacaact atgaaaaaaa gagtaggcct actcatccgt 180

accggggagg gggggggaa tggaggaaat agaatagggg actcatttat atatatataa 240

accaagtatg ttattggttg atcgagtggg aaggaattca atgttcaatt ctgggtttga 300

aacttgctt 309

<210> 5
<211> 378
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(378)
<223> completely synthetic sequence
<400> 5
cccctcaaat gtcaataggt gcgcccctca tctgtcagca ctctgcccct caagtgtcaa 60

ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact 120

tatccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc 180

gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt 240

caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgcccctc atctgtcagt 300

gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg 360

cttcgacggc gtttctgg 378

<210> 6
<211> 211
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 6
ttataatata cacatatata atttatcact gtatattctt gcagagaaca atcacgaggc 60

attggcccct ccatttttt aaaaaaaatt tgatctgata gagaaaagaa agaaagaaaa 120

agaagaatat tagtgacctt tcaatggtga aaaatcaaaa aaaaatctca tttaatgata 180

aacaaaatgt caaacagtct gacagctcct g 211

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthetic sequence
<400> 7
gccaatgcct cgtgattgtt ctctgc 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthetic sequence
<400> 8
gatttgcgag gctggccagc tccacg 26

<210> 9
<211> 589
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(378)
<223> MON531 3' insert sequence, completely synthetic
<220>

EDITED 30/7/2020

<221> misc_feature
<222> (379)..(589)
<223> MON531 3' end Gossypium hirsutum flanking sequence
<400> 9
cccctcaaat gtcaataggt gcgcccctca tctgtcagca ctctgcccct caagtgtcaa 60

ggatcgcgcc cctcatctgt cagtagtcgc gcccctcaag tgtcaatacc gcagggcact 120

tatccccagg cttgtccaca tcatctgtgg gaaactcgcg taaaatcagg cgttttcgcc 180

gatttgcgag gctggccagc tccacgtcgc cggccgaaat cgagcctgcc cctcatctgt 240

caacgccgcg ccgggtgagt cggcccctca agtgtcaacg tccgcccctc atctgtcagt 300

gagggccaag ttttccgcga ggtatccaca acgccggcgg ccgcggtgtc tcgcacacgg 360

cttcgacggc gtttctggtt ataatataca catatataat ttatcactgt atattcttgc 420

agagaacaat cacgaggcat tggcccctcc atttttttaa aaaaaatttg atctgataga 480

gaaaagaaag aaagaaaaag aagaatatta gtgacctttc aatggtgaaa aatcaaaaaa 540

aaatctcatt taatgataaa caaaatgtca aacagtctga cagctcctg 589

<210> 10
<211> 1411
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1104)
<223> completely synthetic insert sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1105)..(1141)
<223> MON531 5' end Gossypium hirsutum flanking sequence
<400> 10
agtacacaaa acaaaagcat catatgctga tttatttatt catagatgga gctcaagtca 60

tagttaaata gcccgatact ttcctcgctc actatgagct attacagcat acattttagt 120

actacatact tattcagtaa aaagccctca aaattgaaga caaaggacgg gatccccggg 180

taccgagctc gaattcaggc ctctagatct cattattcct ccatcaagag aagctccacg 240

ctgtccacga tgaaggttcc ctcggtttca ccgatctcga tccacacttt gtcggtctca 300

ggaaagtact caagctcctt ggtaacatag ccaactggaa gtggtgtgta gtccctgtaa 360

cctctgttga actcgcaagg gttctcacgt ctgccatctg tgtaggattt ctcctcgtac 420

acggaggcat agtcagcagg aacggaagga gcttcgttgt aacctctgtt acggctagtg 480

taggcacctc cgtactcttc ctgattcaca gtgtagtcgt tgcaagtaac ggtgttgttg 540

ggatagattt cttcctcgac gcagttggag aacttaagct cgtcggtgtt gttctcgatc 600

tcgtggatgg tcacgcaacc ctcaccgtat ccctccttgt aagcggtcac acggagaatg 660

207
208
209

tagcctctac ctggacagac tctaacctct tgggacactt cagcttccca ctcaggcaca 720

accaggacgg aacgctgatt gttctgttcc tccacgtcca catgaccttt cacattccag 780

cagctgaggc cattgttgaa gtcaccgttc ttgatgacgt ttctggcatc gtacaaggag 840

aatgcggtaa agatacgtcc ctcaagttcc tcgaagatgg cagcgttcac accagggatc 900

acggacaact caggcaagta agcctcacga atgctgtgca cacgtttgtc tgcggcgtgg 960

atcatggcga tgttggtgtc ggcttgcaac tgatcatatt gggagttcac gaacaaagca 1020

tccacggact ctttggcctc cttgtaaacg atgttagttt cccattcgag tttctcacgt 1080

ttgtccctcc acttcttctc tgctaagtgg gtcagtgggg tggcattggt ttttaatttc 1140

aacgcgtttt gtcgcatata cttttatgat tggggtttct ctttggtgta catcaatgac 1200

cttccctatt gcattgtctg aattttcatc tcttaaatcg gctaaaaaac aactatgaaa 1260

aaaagagtag gcctactcat ccgtaccggg gaggggggag ggaatggagg aaatagaata 1320

ggggactcat ttatatatat ataaaccaag tatgttattg gttgatcgag tgggaaggaa 1380

ttcaatgttc aattctgggt ttgaaacttg c 1411

<210> 11
<211> 2267
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(361)
<223> Gossypium hirsutum 5' end genomic DNA sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (362)..(750)
<223> 5' end chloroplast related DNA sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (751)..(1885)
<223> 5' end Gossypium hirsutum remnant DNA sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1886)..(2267)
<223> 5' end inserted DNA sequence
<400> 11
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60

taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120

tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180

ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240

ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300

ggactatagg gcctagtggt agtcaacagg ccgggcggga aagtattcat ttgaaatggg 360

tttattcgta ttaacagcta ctctaggagg aatgttttta tgcggtgcta acgatttaat 420

aactatcttt gtagctccag aatgtttcag tttatgctcc tacctattat ctggatatac 480

caagaaagat gtacggtcta atgaggctac tacgaaatat ttactcatgg gtggggcaag 540

ctcttctatt ctggttcatg gtttctcttg gctatatggt tcatccgggg gagagatcga 600

gcttcaagaa atagtgaatg gtcttatcaa tacacaaatg tataactccc caggaatttc 660

aattgcgctt atattcatca ctgtaggaat tgggttcaag ctttccccag ccccttctca 720

tcaatggact cctgacgtat acgaaggagt tcttttaggc ttttgcattt tgttgaaaat 780

tcttattttc acaggacttt gcttatcata attattgaca gccaactggt gaaaatggtg 840

ccacgagagc tcccatcagc attgatttgg ctagggatag ttctttaagt gctaagtcaa 900

tcatcttgca aattgacaat aaatctcaac aggtttcagc aagtaaggcc tccttcatta 960

ttttggttgc ttctttttca ttaatgatgt tgcttgtttg cacctggaaa acatgcaccg 1020

ttcttcatca tgcaccttgg atatggtctt gagtgctctc tgactgcccg tcatctttcg 1080

aattggtgtc tgattgagtg cacccgccta agttcaagat gccggagttt gaatagtata 1140

acgggactag ttgtcttgag gctcatatta ctatgttctg tcgatataat catccatggg 1200

cttcgcatcc accattgcaa ggcccaacca cctagcactg tgatgggtcc aaacgcaaag 1260

gtgatcccct taggccaaat ggatggagac gctataagat tggtcaccgc aagaaaagtg 1320

tggatcgata ggccctgtag ttgatgatgg ggatgatcac gatgaccctg cctatcctcc 1380

aagtttcacc ccaactaaca tccaagtgca accagaggtg tacccgcaga gggcacctat 1440

taccattaga tcgactgcaa gtgtaggtaa tgttggacag ggtagatcag ggtgttcacg 1500

gtgtggtaga ctttactatg gtccttttcg ggcaggcgaa aatgtttgtt ataaatgcgg 1560

cactccagat cattttgtac gagaatgtcc agaggtggct aatcgagaga atcgaatcac 1620

ttacgaaaaa agattattgt tactaagttt tcatgtttta tgccatgcgt agccatgttt 1680

ttaataaagg gttgaagact tgaatgacaa gttagcgtaa agcatttttt ttctttcatg 1740

ttggcacatt tgatgcacta tgtcttcgtc tatttttcaa acatactgtt ggaagaatta 1800

tgattcacgt gttgtttaag atcaaaaagt gcatgcctaa ctaatactta tcagaaacaa 1860

ataatgcaat gagtcatatc tctataaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 1920

tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctcctacaaa 1980

tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtggtccc 2040

aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 2100

tcaaagcaag tggattgata tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac 2160

tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga ggaggacacgc 2220

5029705 05-04-04

tgacaagctg actctagcag atctccatgg tccgtcctgt agaaacg 2267

<210> 12
<211> 1361
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(349)
<223> 3' end insert sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (674)..(1361)
<223> 3' end iGossypium hirsutum chromosomal sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (350)..(673)
<223> 3' end Gossypium hirsutum remnant DNA sequence
<400> 12
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag gagctctgat ccccatggga attcccgatc 60

gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 120

ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 180

cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga 240

tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt 300

tactagatcg gggatatccc cggggcggcc gctctagaac tagtggatct gcactgaaat 360

cccatccatt tagcaacctt aaaagtaata aacttaaact aagtgtactc cttatcaaaa 420

cataaaccaa gagatgagga taacagcgtt cggccaaccc caataccacc tataatcaaa 480

gcatgcgatg tcacgaacgt tttcctgacg gcaatcgaca caaagaagag attaaaaagg 540

gagaccacta tagaaagaag aaagagaatc ggcaccactg tgaaactaca tttgataacc 600

gtattagcaa ggctccacca ttgataaaaa ctcgacaacc aagaggaact cacttaccct 660

gatcaaagta ggggttgttg gtactaaggc tcaaagcaag gaaaatgtct aaatgagtga 720

gttgggcttt tttaatttaa ttaaactgaa aaataagaaa ggatgttgcc aattttgtgt 780

ggcaaggacg gacaagaggt ttcgacccaa cctagagaag acattaaaac tgcagaactg 840

ggctcgcttg ttcaggatcg ggctttaaag gagaatggtt tgatggacca gaatagagac 900

aaaccaatac actcagattt tgatcttcct tattctccct caactattga ttttgttttg 960

ggtaatgatg gtgtagcagg ggatcgggtt ttaggtgttt ttcaaggcat gactgttact 1020

cattttaatc cgacttgcga tgaccataat gagatggagg ctgtactgaa ggatgaagta 1080

ttggatccaa ataggcattc gacatgtttg ataaaactct tagttacaaa attcttagta 1140

aacgaatcca taaggttatc tttagatgtt attttcatca catctataat tctttcagct 1200

actgcctctt gtatcaagtg atactttcag tcagtatatt cgtcttgcag cactgttatc 1260

acaatacagt gttatatctt tttctatatc aggaatgact tcaagatcgg ttaagaactt 1320

ttaaagccat attgtttctt tcgtagcctc agaagcaacc a 1361

<210> 13
<211> 1050
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 13
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60

taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120

tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180

ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240

ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300

ggactatagg gcctagtggt agtcaacagg ccgggcggga aagtattcat ttgaaatggg 360

ttgttgttgg tactaaggct caaagcaagg aaaatgtcta aatgagtgag ttgggctttt 420

ttaatttaat taaactgaaa aataagaaag gatgttgcca attttgtgtg gcaaggacgg 480

acaagaggtt tcgacccaac ctagagaaga cattaaaact gcagaactgg gctcgcttgt 540

tcaggatcgg gctttaaagg agaatggttt gatggaccag aatagagaca aaccaataca 600

ctcagatttt gatcttcctt attctccctc aactattgat tttgttttgg gtaatgatgg 660

tgtagcaggg gatcgggttt taggtgtttt tcaaggcatg actgttactc attttaatcc 720

gacttgcgat gaccataatg agatggaggc tgtactgaag gatgaagtat tggatccaaa 780

taggcattcg acatgtttga taaaactctt agttacaaaa ttcttagtaa acgaatccat 840

aaggttatct ttagatgtta ttttcatcac atctataatt ctttcagcta ctgcctcttg 900

tatcaagtga tactttcagt cagtatattc gtcttgcagc actgttatca caatacagtg 960

ttatatcttt ttctatatca ggaatgactt caagatcggt taagaacttt taaagccata 1020

ttgtttcttt cgtagcctca gaagcaacca 1050

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' event end cotton genome sequence flanking chloroplast related sequence
<400> 14

208
213
212

tgaaatgggt ttattcgtat 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' end chloroplast related sequence adjacent to 5' end cotton genome sequence
<400> 15
acgaaggagt tcttttaggc 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 5' end cotton genomic remnant sequence adjacent to 5' end insert sequence
<400> 16
atatctctat aaagggtaat 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 3' end insert sequence at NOS3' adjacent to 3' end cotton genomic
<400> 17
ctagtggatc tgcactgaaa 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 3' end cotton genomic remnant sequence adjacent to 3' end Gossypium hirsutum chromosome sequence
<400> 18
caaagtaggg gttgttggta 20

<210> 19
<211> 361
<212> DNA

PATENT- 05/24/2219

<213> Gossypium hirsutum
<400> 19
cttgtcattg gtgcagacag gttcggggag tatggcctat gggtggtggt agagagaaag 60

taacagcgaa atcttagggt ggtccgagaa atgagattgt taagtcctga tttaatgtgc 120

tgagttcagt tgatggagag gaaaatggca aagatttgag gggagaggat tttgtggatc 180

ctaacattaa acagaatcgt tctactaaaa ggggtaaggg tagtggtgga agagatattt 240

ttaaaaaagc taaggtaaaa tctgggcaaa gttttaacgt ggcccagggg aataaaaaag 300

ggactatagg gcctagtggt agtcaacagg ccgggcggga aagtattcat ttgaaatggg 360

t 361

<210> 20
<211> 389
<212> DNA
<213> unidentified plant
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(389)
<223> chloroplast related DNA sequence adjacent to 5' flanking Gossypium hirsutum chromosome sequence
<400> 20
ttattcgtat taacagctac tctaggagga atgtttttat gcggtgctaa cgatttaata 60

actatctttg tagctccaga atgtttcagt ttatgctcct acctattatc tggatatacc 120

aagaaagatg tacggtctaa tgaggctact acgaaatatt tactcatggg tggggcaagc 180

tcttctattc tggttcatgg tttctcttgg ctatatggtt catccggggg agagatcgag 240

cttcaagaaa tagtgaatgg tcttatcaat acacaaatgt ataactcccc aggaatttca 300

attgcgctta tattcatcac tgtaggaatt gggttcaagc tttccccagc cccttctcat 360

caatggactc ctgacgtata cgaaggagt 389

<210> 21
<211> 1135
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 21
tcttttaggc ttttgcattt tgttgaaaat tcttattttc acaggacttt gcttatcata 60

attattgaca gccaactggt gaaaatggtg ccacgagagc tcccatcagc attgatttgg 120

ctagggatag ttctttaagt gctaagtcaa tcatcttgca aattgacaat aaatctcaac 180

aggtttcagc aagtaaggcc tccttcatta ttttggttgc ttctttttca ttaatgatgt 240

tgcttgtttg cacctggaaa acatgcaccg ttcttcatca tgcaccttgg atatggtctt 300

gagtgctctc tgactgcccg tcatctttcg aattggtgtc tgattgagtg cacccgccta 360

Fax from:6507247205

agttcaagat gccggagttt gaatagtata acgggactag ttgtcttgag gctcatatta 420

ctatgttctg tcgatataat catccatggg cttcgcatcc accattgcaa ggcccaacca 480

cctagcactg tgatgggtcc aaacgcaaag gtgatccctt taggccaaat ggatggagac 540

gctataagat tggtcaccgc aagaaaagtg tggatcgata ggccctgtag ttgatgatgg 600

ggatgatcac gatgaccctg cctatcctcc aagtttcacc ccaactaaca tccaagtgca 660

accagaggtg tacccgcaga gggcacctat taccattaga tcgactgcaa gtgtaggtaa 720

tgttggacag ggtagatcag ggtgttcacg gtgtggtaga ctttactatg gtccttttcg 780

ggcaggcgaa aatgtttgtt ataaatgcgg cactccagat cattttgtac gagaatgtcc 840

agaggtggct aatcgagaga atcgaatcac ttacgaaaaa agattattgt tactaagttt 900

tcatgtttta tgccatgcgt agccatgttt ttaataaagg gttgaagact tgaatgacaa 960

gttagcgtaa agcatttttt ttctttcatg ttggcacatt tgatgcacta tgtcttcgtc 1020

tatttttcaa acatactgtt ggaagaatta tgattcacgt gttgtttaag atcaaaaagt 1080

gcatgcctaa ctaatactta tcagaaacaa ataatgcaat gagtcatatc tctat 1135

<210> 22
<211> 382
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(382)
<223> completely synthesized 5' end insert sequence corresponding to e35S promoter sequence
<400> 22
aaagggtaat atccggaaac ctcctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg 60

tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg 120

ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccа cccacgagga 180

gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatatgata 240

tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta 300

tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaca agctgactct agcagatctc 360

catggtccgt cctgtagaaa cg 382

<210> 23
<211> 349
<212> DNA
<213> Agrobaterium tumefaciens
<400> 23
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag gagctctgat ccccatggga attcccgatc 60

gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 120

ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 180

cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga 240

tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt 300

tactagatcg gggatatccc cggggcggcc gctctagaac tagtggatc 349

<210> 24
<211> 324
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 24
tgcactgaaa tcccatccat ttagcaacct taaaagtaat aaacttaaac taagtgtact 60

ccttatcaaa acataaacca agagatgagg ataacagcgt tcggccaacc ccaataccac 120

ctataatcaa agcatgcgat gtcacgaacg ttttcctgac ggcaatcgac acaaagaaga 180

gattaaaaag ggagaccact atagaaagaa gaaagagaat cggcaccact gtgaaactac 240

atttgataac cgtattagca aggctccacc attgataaaa actcgacaac caagaggaac 300

tcacttaccc tgatcaaagt aggg 324

<210> 25
<211> 688
<212> DNA
<213> Gossypium hirsutum
<400> 25
gttgttggta ctaaggctca aagcaaggaa aatgtctaaa tgagtgagtt gggctttttt 60

aatttaatta aactgaaaaa taagaaagga tgttgccaat tttgtgtggc aaggacggac 120

aagaggtttc gacccaacct agagaagaca ttaaaactgc agaactgggc tcgcttgttc 180

aggatcgggc tttaaaggag aatggtttga tggaccagaa tagagacaaa ccaatacact 240

cagattttga tcttccttat tctccctcaa ctattgattt tgttttgggt aatgatggtg 300

tagcagggga tcgggtttta ggtgtttttc aaggcatgac tgttactcat tttaatccga 360

cttgcgatga ccataatgag atggaggctg tactgaagga tgaagtattg gatccaaata 420

ggcattcgac atgtttgata aaactcttag ttacaaaatt cttagtaaac gaatccataa 480

ggttatcttt agatgttatt ttcatcacat ctataattct ttcagctact gcctcttgta 540

tcaagtgata ctttcagtca gtatattcgt cttgcagcac tgttatcaca atacagtgtt 600

atatcttttt ctatatcagg aatgacttca agatcggtta agaactttta aagccatatt 660

gtttctttcg tagcctcaga agcaacca 688

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized
<400> 26
gtggcccagg ggaataaaa 19

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> completely synthesized
<400> 27
ttgcgaagga tagtgggatt gtg 23

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized
<400> 28
taatacgcga tagaaaacaa aata 24

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized
<400> 29
ctaaaacccg atcccctgct acac 24

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)

<223> completely synthesized
<400> 30
gactgaatgc ccacaggccg tcgagtt 27

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> completely synthesized
<400> 31
cctgaactct ggcacccagt tcgacc 26

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> completely synthesized
<400> 32
ggtttctaca ggacggacca tggagatctg c 31

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> completely synthesized
<400> 33
ccaactaaca tctcgccgct gtactgatag g 31

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized
<400> 34
tggttgcttc tgaggctac 19

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> completely synthesized
<400> 35

R18
Z19
Z14

24

cttgtcattg gtgcagacag gttc

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> completely synthesized
<400> 36
gcttcaccat ctctccaatc cacg

24

PCT/SG2005/000205

~~215~~
220
219

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODO AQUEL A QUIEN CONCIERNA LO PRESENTE

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

11 de junio de 2002

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE ADJUNTA A LA MISMA HAY UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA EN LO QUE SIGUE, QUE CUMPLEN LOS REQUISITOS PARA OTORGARLE UNA FECHA DE PRESENTACIÓN BAJO 35 USC 111.

NÚMERO DE SOLICITUD: 60/297,406
FECHA DE PRESENTACIÓN: 11 de junio de 2001

Por la Autoridad del
COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS

P. SWAIN

Oficial certificador

~~216~~
~~221~~
220

Lo que se reivindica es:

1. Una planta de algodón resistente a insectos, o partes de la misma, semilla de dicha planta de algodón, la cual ha sido depositada con la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo el número de acceso PTA-2516.

COLO 12746-801-002-1
MRE

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 17th. day of JULY, 2002.
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 76728
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

223

~~218~~ 222

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by NORMA R. POPE

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. bears the seal/stamp of NORMA R. POPE-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 17th. day of JULY, 2002.

7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 76726

9. Seal/Stamp

10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

223
224
819

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 6 - COLOMBIA

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, y Sean Doherty,

domiciliado(s) en 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente,

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:
PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos) sin limitación, a favor de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC

constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, and Sean Doherty,

of 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 and 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, United States of America, respectively,

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of MONSANTO TECHNOLOGY LLC

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of the state of Delaware, United States of America

domiciled in 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent application, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/ Given and signed this _____

_____

en/in _____

X _____ Scott Huber 6/24/02

Firma — Signature

Scott A. Huber

_____ Dennis R. Hoerner, Jr. 2 July 2002

Firma — Signature

Dennis R. Hoerner, Jr.
President & Intellectual Property Counsel

224
225
220

STATE OF MISSOURI §
§ ss.
COUNTY OF ST. LOUIS §

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 2nd day of July, 2002, personally appeared Dennis R. Hoerner, Jr., known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument on behalf of Monsanto Technology LLC, and acknowledged to me that he is authorized to validly sign alone such an assignment on behalf of said company.

Norma R. Pope
Notary

" NOTARY SEAL "
Norma R. Pope, Notary Public
St. Louis County, State of Missouri
My Commission Expires 4/10/2005

225

226

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 24 días del mes de junio de 2002 ante mí, Notario Público de _____ compareció(eron) personalmente Scott A. Huber

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

_____ Notario Público/Notary Public

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

X

On this 24th day of June 2002 before me, a Notary Public of St. Louis County personally appeared Scott A. Huber

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

Michelle Ludwig

MICHELLE LUDWIG
St. Louis County
My Commission Expires
July 13, 2005

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

Monsanto Technology LLC
COLO 12746-801-002-1

54

226
227
222

TRADUCCIÓN OFICIAL No 09.08/02d realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Cesión escrito en inglés y español por medio del cual **Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley y Sean Doherty,** domiciliados en el 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención:

PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

y así mismo declaran que ceden y transfieren, sin limitación, a favor de la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** constituida y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en el 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América todos los derechos inherentes a dicha invención y que dicha compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado hoy_____

_____

en _____

Firma Ilegible *6/29/02*

228
223
227

Firma Firma

Scott A. Huber

Firma Ilegible *2 de julio de 2002*

Firma Firma

Dennis R. Hoerner, Jr.
Presidente y Asesor de Propiedad Intelectual

AUTENTICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO) del 24 de junio de 2002 expedida por Notario Público del Estado de Missouri en donde se autentica la firma anterior de *Scott A. Huber*.

Notario Público *Firma Ilegible*

Sello:

MICHELLE LUDWIG
Condado de San Louis
Mí Comisión Vence 13 de Julio de 2005

Aparece formato de Apostille sin diligenciar

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por MICHELLE LUDWIG

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de MICHELLE LUDWIG - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

228
229
224

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. **No.** 76728

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

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO
MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

ESTADO DE MISSOURI §
§ ss.
CONDADO DE SAN LOUIS §

ANTE MÍ, la autoridad suscrita, hoy *2* de *julio* de 2002, personalmente compareció Dennis R. Hoerner Jr., quien conozco ser la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior instrumento a nombre de Monsanto Technology LLC, y reconoció ante mí que él está debidamente autorizado a firmar solo dicha cesión a nombre de dicha compañía.

Firma Ilegible

Notario

"SELLO NOTARIAL"
Norma R. Pope, Notario Público
Condado de San Louis, Estado de Missouri
Mí Comisión Vence 4/10/2005

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493902

Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:35

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS
Notario Sexto Encargado

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR.
[illegible]
ESTADOS CON C.C. No.(s)
ESTADO(S) AUTENTICAS)
SANTAFE DE BOGOTA, 12 AUG 2002

225
229
230

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por NORMA R. POPE

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de NORMA A. POPE - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. **No. 76726**

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO

MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

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

DVZ//ID-3590/WPCL002G/COLO 12746-807-002-1

Diego F. Vargas

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

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

493903
Diego Vargas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:35

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



78

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 17th. day of JULY, 2002.
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 76727
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

229
231
232

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 17th. day of JULY, 2002.
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 76724
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

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

356

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, y Sean Doherty,

domiciliado(s) en 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente,

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:
PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos) sin limitación, a favor de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC

constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, and Sean Doherty,

of 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 and 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, United States of America, respectively,

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of MONSANTO TECHNOLOGY LLC

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of the state of Delaware, United States of America

domiciled in 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent application, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/ Given and signed this_____

_____

en/in _____

James K. Roberts June 25 2002

Firma Signature

Dennis R. Hoerner, Jr. 2 July 2002

Firma Signature

Dennis R. Hoerner, Jr., President
Intellectual Property Counsel

STATE OF MISSOURI §
§ ss.
COUNTY OF ST. LOUIS §

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 2nd day of July, 2002, personally appeared Dennis R. Hoerner, Jr., known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument on behalf of Monsanto Technology LLC, and acknowledged to me that he is authorized to validly sign alone such an assignment on behalf of said company.

Norma R. Pope
Notary

" NOTARY SEAL "
Norma R. Pope, Notary Public
St. Louis County, State of Missouri
My Commission Expires 4/10/2005

~~250~~
~~235~~
234

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 26 días del mes de junio de 2002 ante mí, Notario Público de _____ compareció(eron) personalmente James K. Roberts

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

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

On this 25th day of June 2002 before me, a Notary Public of St. Louis County personally appeared James K. Roberts

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

_____ Notario Público/Notary Public Michelle Ludwig

MICHELLE LUDWIG
St. Louis County
My Commission Expires
July 13, 2005

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

235
236
237

TRADUCCIÓN OFICIAL No 09.08/02e realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Cesión escrito en inglés y español por medio del cual **Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley y Sean Doherty,** domiciliados en el 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención:

PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

y así mismo declaran que ceden y transfieren, sin limitación, a favor de la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** constituida y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en el 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América todos los derechos inherentes a dicha invención y que dicha compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado hoy_____

_____

en _____

Firma Ilegible *Junio 25 de 2002*

Firma

Firma

James K. Roberts

Firma Ilegible *2 de julio de 2002*

Firma

Firma

Dennis R. Hoerner, Jr.
Presidente y Asesor de Propiedad Intelectual

AUTENTICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO) del 25 de junio de 2002 expedida por Notario Público del Estado de Missouri en donde se autentica la firma anterior de James K. Roberts.

Notario Público *Firma Ilegible*

Sello:

MICHELLE LUDWIG
Condado de San Louis
Mí Comisión Vence 13 de Julio de 2005

Aparece formato de Apostille sin diligenciar

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por MICHELLE LUDWIG

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de MICHELLE LUDWIG - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. **No.** 76727

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

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO
MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

ESTADO DE MISSOURI §
§ ss.
CONDADO DE SAN LOUIS §

ANTE MÍ, la autoridad suscrita, hoy 2 de julio de 2002, personalmente compareció Dennis R. Hoerner Jr., quien conozco ser la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior instrumento a nombre de Monsanto Technology LLC, y reconoció ante mí que él está debidamente autorizado a firmar solo dicha cesión a nombre de dicha compañía.

Firma Ilegible

Notario

"SELLO NOTARIAL"
Norma R. Pope, Notario Público
Condado de San Louis, Estado de Missouri
Mí Comisión Vence 4/10/2005

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493904

Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:36

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



238
233

239

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por NORMA R. POPE

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de NORMA A. POPE - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. **No.** 76724

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO

MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

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

DVZ//ID-3591/WPCL002G/COLO 12746-807-002-1

Diego F. Vargas

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493905

Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:36

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS
Notario Sexto Encargado

PODER JURIS CIVILES

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HACE CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) EN EL PRESENTE DOCUMENTO FUE(RON) RECONOCIDA(S)
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)
ESTE(SON) AUTENTICA(S)
SANTAFE DE BOGOTA, 12 AUG 2002

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

2. This public document has been signed by JAYNE S. CRESON

3. acting in the capacity of COUNTY CLERK OF SHELBY COUNTY, TENNESSEE

4. bears the seal/stamp of COUNTY SEAL OF SHELBY COUNTY, TENNESSEE

Certified

5. at *Nashville, Tennessee*

6. the Tuesday, July 30, 2002

7. by RILEY C. DARNELL, SECRETARY OF STATE, STATE OF TENNESSEE

8. No. 02-6177



10. Signature

Riley C. Darnell

240

241

~~235~~

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by NORMA R. POPE

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. bears the seal/stamp of NORMA R. POPE-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 17th. day of JULY, 2002.

7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 76723

9. Seal/Stamp

10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

236
241
242

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

356

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, y Sean Doherty,

domiciliado(s) en 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente,

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:
PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos) sin limitación, a favor de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC

constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, and Sean Doherty,

of 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 and 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, United States of America, respectively,

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of MONSANTO TECHNOLOGY LLC

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of the state of Delaware, United States of America

domiciled in 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent application, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/ Given and signed this 6-28-02

cn/in

Firma

Signature

Zachary W. Shappley

Firma

Signature

Dennis R. Hoerner, Jr. 2 July 2002

Dennis R. Hoerner, Jr.
President & Intellectual Property Counsel

242

STATE OF MISSOURI §
§ ss.
COUNTY OF ST. LOUIS §

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 2nd day of July, 2002, personally appeared Dennis R. Hoerner, Jr., known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument on behalf of Monsanto Technology LLC, and acknowledged to me that he is authorized to validly sign alone such an assignment on behalf of said company.

Norma R. Pope
Notary

" NOTARY SEAL "
Norma R. Pope, Notary Public
St. Louis County, State of Missouri
My Commission Expires 4/10/2005

238
243

STATE OF TENNESSEE
SHELBY COUNTY
CLERK'S OFFICE } ss.

JAYNE S. CRESON, *Clerk of said County do hereby certify*

that TAMARA SWAIN

before whom the annexed instrument was taken, and whose name is subscribed in the certificate of proof thereof, was, at the time of taking the same, a Notary Public in and for said county, duly sworn and acting as such, and authorized to take the same, and was also authorized to take acknowledgments to deeds or conveyances of land within the state aforesaid; and further, that I am well acquainted with his handwriting, and verily believe the signature thereto to be his genuine signature; and further, that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of Tennessee.

In testimony whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said County, at Memphis, Tennessee, this

25TH *day of*

JULY, *2002*

Jayne S. Creson *Clerk.*

FORMS CONTROL S-802026-T

239
~~245~~
244

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 28 dias del mes de Junio de 2002 ante mí, Notario Público de Tennessee compareció(eron) personalmente Zachary W. Shappley

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

Notario Público/Notary Public

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

On this 28 day of June 2002 before me, a Notary Public of Tennessee personally appeared Zachary W. Shappley

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

Damaris Swan

My Commission Expires March 5, 2005

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

Monsanto Technology LLC

COLO 12746-801-002-1

92

245
246
248

TRADUCCIÓN OFICIAL No 09.08/02b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Cesión escrito en inglés y español por medio del cual **Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley y Sean Doherty,** domiciliados en el 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención:

PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

y así mismo declaran que ceden y transfieren, sin limitación, a favor de la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** constituida y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en el 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América todos los derechos inherentes a dicha invención y que dicha compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado hoy_____

_____

en _____

Firma Ilegible *6-28-02*

~~247~~ 246 247

Firma Firma

Zachary W. Shappley

Firma Ilegible *Julio 2 de 2002*

Firma Firma

Dennis R. Hoerner, Jr.
Presidente y Asesor de Propiedad Intelectual

AUTENTICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO) del 28 de junio de 2002 expedida por Notario Público del Estado de Tennessee en donde se autentica la firma anterior de *Zachary W. Shappley*.

Notario Público *Firma Ilegible*

Mí Comisión Vence Marzo 5 de 2005

Aparece formato de Apostille sin diligenciar

ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY
OFICINA DEL SECRETARIO

JAYNE S. CRESON, Secretario de dicho Condado por el presente certifico que TAMARA SWAIN ante quién el documento anexo fue tomado, y cuyo nombre está suscrito en el certificado de prueba del mismo, era, al momento de tomar el mismo, un Notario Público en y para dicho condado, debidamente juramentado y ejerciendo como tal y autorizado para tomar el mismo y así mismo estaba autorizado para tomar reconocimientos de escrituras o transferencias de tierras dentro de dicho estado; y adicionalmente que estoy bien familiriazido con su escritura y creo relamente que la firma en el mismo es su firma auténtica; y adicionalmente que el anexo instrumento ha sido suscrito y reconocido en concordancia con las leyes del Estado de Tennessee.

247
248
249

En testimonio de lo cual, he suscrito el presente y fijado el sello de dicho Condado en Memphis, Tennessee, hoy

25 de julio de 2002

Firma Ilegible Secretario.

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
2. Este documento público ha sido firmado por JAYNE S. CRESON
3. actuando en calidad de SECRETARIO DE CONDADO DEL CONDADO DE SHELBY, TENNESSEE
4. lleva sello/estampilla de SECRETARIO DE CONDADO DEL CONDADO DE SHELBY, TENNESSEE

Certificado

5. En *Nashville, Tennessee*
6. El Martes, 30 de julio de 2002
7. por RILEY C. DARNELL, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE TENNESSEE

8. No. 02-6177

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

10. Firma

Firma Ilegible

EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE TENNESSEE 1796

ESTADO DE MISSOURI §
§ ss.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

493898
Diego Vargas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:34

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



248
249
293

CONDADO DE SAN LOUIS §

ANTE MÍ, la autoridad suscrita, hoy 2 de julio de 2002, personalmente compareció Dennis R. Hoerner Jr., quien conozco ser la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior instrumento a nombre de Monsanto Technology LLC, y reconoció ante mí que él está debidamente autorizado a firmar solo dicha cesión a nombre de dicha compañía.

Firma Ilegible

Notario

"SELLO NOTARIAL"
Norma R. Pope, Notario Público
Condado de San Louis, Estado de Missouri
Mí Comisión Vence 4/10/2005

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por NORMA R. POPE

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de NORMA A. POPE - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

249
250
244

8. **No.** 76723

9. Sello/estampilla: 10. Firma

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO

MISSOURI

Matt Blunt

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

DVZ//ID-3586/WPCL002G/COLO 12746-807-002-1

Diego F. Vargas

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

~~116~~

97

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

ENTINCADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 12 AUG 2002

CODEX JURIS CIVILIS

NOTARIA SEXTA

BARAJAS

Notario Sexto Encargado

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:31

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

493899
Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 17th. day of JULY, 2002.
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 76729
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

246
252 251

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 17th. day of JULY, 2002.
7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 76725
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)

MOBT:232-CO 38-21(52211)A CO

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

356

~~247~~ 252

283

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, y Sean Doherty,

domiciliado(s) en 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente,

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:
PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos) sin limitación, a favor de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC

constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley, and Sean Doherty,

of 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 and 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, United States of America, respectively,

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

COTTON EVENT MON15985 AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of MONSANTO TECHNOLOGY LLC

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of the state of Delaware, United States of America

domiciled in 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent application, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/ Given and signed this_____

en/in _____

X 7/12/02 Sean C. Doherty

Firma Signature

Sean Doherty

7/12/02 Dennis R. Hoerner, Jr.

Firma Signature

Dennis R. Hoerner, Jr.
President & Intellectual Property Counsel

253
254

STATE OF MISSOURI §
§ ss.
COUNTY OF ST. LOUIS §

BEFORE ME, the undersigned authority, on this 12th day of July, 2002, personally appeared Dennis R. Hoerner, Jr., known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument on behalf of Monsanto Technology LLC, and acknowledged to me that he is authorized to validly sign alone such an assignment on behalf of said company.

Norma R Pope
Notary

" NOTARY SEAL "
Norma R. Pope, Notary Public
St. Louis County, State of Missouri
My Commission Expires 4/10/2005

249
254
255

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 12 dias del mes de Julio de 2002 ante mí, Notario Público de _____ compareció(eron) personalmente Sean Doherty

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

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

On this 12th day of July 2002 before me, a Notary Public of _____ personally appeared Sean Doherty

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

Notario Público/Notary Public Gracie L. Williams

July, 12, 2002

GRACIE L. WILLIAMS
St. Louis County
My Commission Expires
July 9, 2005

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

Monsanto Technology LLC
COLO 12746-801-002-1

[redacted]
102

255
256

TRADUCCIÓN OFICIAL No 09.08/02c realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Cesión escrito en inglés y español por medio del cual **Scott A. Huber, James K. Roberts, Zachary W. Shappley y Sean Doherty,** domiciliados en el 681 Hidden Path, Apt. D, Creve Coeur, MO 63141, 15422 Clover Ridge Dr., Chesterfield, MO 63017, 3597 Waterford Cove South, Collierville, TN 38017 y 1446 Rankin, Richmond Heights, MO 63117, Estados Unidos de América, respectivamente, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención:

PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO

y así mismo declaran que ceden y transfieren, sin limitación, a favor de la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** constituida y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en el 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América todos los derechos inherentes a dicha invención y que dicha compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado hoy_____

_____

en _____

7/12/02 *Firma Ilegible*

Firma Firma

Sean Doherty

7/12/02 *Firma Ilegible*

Firma Firma

Dennis R. Hoerner, Jr.
Presidente y Asesor de Propiedad Intelectual

AUTENTICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO) del 12 de julio de 2002 expedida por Notario Público del Estado de Missouri en donde se autentica la firma anterior de *Sean Doherty*.

Notario Público *Firma Ilegible*

Julio 12 de 2002

Sello:

GRACIE L. WILLIAMS
Condado de San Louis
Mí Comisión Vence 9 de Julio de 2005

Aparece formato de Apostille sin diligenciar

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por GRACIE L. WILLIAMS

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de GRACIE L. WILIAMS - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

Diego F. Vargas

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

8. **No.** 76729

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO
MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

ESTADO DE MISSOURI §
§ ss.
CONDADO DE SAN LOUIS §

ANTE MÍ, la autoridad suscrita, hoy 2 de julio de 2002, personalmente compareció Dennis R. Hoerner Jr., quien conozco ser la persona cuyo nombre se suscribe en el anterior instrumento a nombre de Monsanto Technology LLC, y reconoció ante mí que él está debidamente autorizado a firmar solo dicha cesión a nombre de dicha compañía.

Firma Ilegible

Notario

"SELLO NOTARIAL"
Norma R. Pope, Notario Público
Condado de San Louis, Estado de Missouri
Mí Comisión Vence 4/10/2005

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

493900
Diego Vargas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 12 A 9:35

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



258
259

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por NORMA R. POPE

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de NORMA A. POPE - NOTARIO PÚBLICO -ESTADO DE MISSOURI

Certificado

5. En Jefferson City, Missouri

6. El 17 de JULIO de 2002

7. por Matt Blunt, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. **No.** 76725

9. Sello/estampilla:

SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO

MISSOURI

10. Firma

Matt Blunt

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

DVZ//ID-3589/WPCL002G/COLO 12746-807-002-1

Diego F. Vargas

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

106

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HACE CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) EN [illegible]

Virginia Vego G.

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 12 AUG 2002

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS
Notario Sexto Encargado

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493901

2002 AUG 12 A 9:35

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

254
259

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 164

Radicación no 02-49630

Concepto Técnico no **947**
Clasificación Internacional de Patentes: **A01H 01/06**

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [X] NO [ ] Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).

SI [X] NO [ ] Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).

SI [X] NO [ ] Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).

SI [X] NO [ ] NO ES APLICABLE [ ] Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)

SI [X] NO [ ] Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).

SI [ ] NO [X] NO ES APLICABLE [ ] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).

SI [ ] NO [ ] NO ES APLICABLE [X]Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afro americanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).

SI [X] NO [ ] La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).

SI [X] NO [ ] NO ES APLICABLE [ ]La prioridad coincide con la materia reivindicada.

SI [X] NO [ ] CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [ ] NO [X] ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202052

Bogotá D. C., diciembre 19 de 2003.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 165

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)
MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

REFERENCIA:

Radicación No.	02-49630
Trámite	002
Evento	001
Actuación	416
Oficio No.	1486
Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 26 DIC. 2003

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202052

261

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA
TELEFONO: (57) (1) 347-3611
7-3170

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000004 Folios: 2
Fecha (AMD): 2004-08-17 16:46:03
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 538 PETICION
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S D.

Trámite : 002
Evento : 538
Actuación: 411

Referencia : Expediente No. 02.049.630

Solicitante : MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Asunto : Solicitud de patente para: PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO.

Publicada en : La Gaceta No. 537 Del 27 de febrero de 2004

1. Yo, Emilio FERRERO, identificado como aparece al pie de mi firma, actuando como apoderado en el asunto de la referencia, atentamente, solicito se efectúe el examen de patentabilidad de la solicitud en referencia presentada de acuerdo con el artículo 44 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Para tal efecto presento junto con este escrito el recibo No. 04 –28.001 por valor de $ 353.000.00, que corresponde a la tasa fijada según lo dispuesto en la resolución No. 37323 del 30 de diciembre de 2003.

2. Ruego atentamente a la Señora Jefe se sirva ordenar que se anexe este recibo para que se efectúe dicho examen y se continúe con el trámite de la solicitud.

Bogotá, 17 AGO. 2004
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746 801 002 1
MRE/MRM/
ID-000014/WPC12746

262
16A

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000004 Folios: 2
Fecha (AMD): 2004-08-17 16:46:03
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 536 PETICION
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 28,001
FECHA : ABRIL 5 DE 2004

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	22156876	05/04/2004	42,043,800.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	85	EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	353,000.00
			TOTAL : $	353,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Folio 12796-801-002-1

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. **01- 49630**

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION** FUE PUBLICADO

EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **537**, DE FECHA **27** DE **FEBRERO** DE **2004**,

EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY EXPIRA EL **27** DE **MAYO** DE **2003**.

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI ____ _____ NO ____ **X** _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor
EMILIO FERRERO
Monsanto Technology
(Apoderado)

ASUNTO

Radicación 02-49630
Trámite 002
Evento 001
Actuación 430
Oficio 5591
Folios

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 66 a 148) y las reivindicaciones 1 a 16(folios: 149 a 153).

La presente solicitud reivindica prioridad Americana Nº 60/297,406 de 11 de junio de 2001 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

La presente solicitud se refiere a una planta de algodón evento MON 15985 depositada como ATCC PTA-2516, en donde por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada a partir del grupo de SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 forma parte del genoma de la planta. Así mismo se reclama la planta descendiente que posee dentro de su genoma las secuencias SEC ID No14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18, y las semillas de cualquiera de las plantas mencionadas anteriormente. Por otra parte se reivindica el método para producir una planta de algodón resistente a herbicidas que comprende cultivar con una planta de las anteriormente descritas y seleccionar la progenie.
También hacen parte de la invención las secuencias aisladas que comprenden las SEC ID: 27, 28, 29, 30, 31,32, 33, 34, 35 y 36 y aquellas secuencias de por lo menos 10 nucleótidos que usadas juntas en un PCR producen una amplificación de diagnóstico para MON15985. De igual manera se incluyen las secuencias anteriores que son escogidas dentro de la SEC ID No 11 u 12. Además se reivindican métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 en el tejido de algodón que comprende la selección de cebadores que hibridizan sobre secuencias que flanquean la secuencia de inserción MON15985 y la amplificación del segmento de interés. Por último se reclaman los kits de detección de ADN que comprenden las sondas que hibridizan con las secuencias SEC ID No 14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o que contienen los cebadores que hibridizan con las

secuencias flanqueantes de MON 15985.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC A01H 1/006

Claridad de la solicitud:

El artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

Las reivindicaciones 5, reclama un método para producir una planta de algodón que comprende cultivar con una planta de las reivindicaciones precedentes y seleccionar la progenie. De la redacción de la presente cláusula no queda claro cual es el objeto reclamado para poder efectuar una comparación con el estado de la técnica. Al parecer se pretende reclamar el cruce de una planta con otra y en este caso cabe mencionar que el cruce entre plantas implica necesariamente la etapa de reproducción, lo cual constituye un procedimiento esencialmente biológico, independientemente si este se efectúa entre organismos modificados genéticamente o no; de igual forma las plantas y sus células han sido generadas mediante un proceso biológico natural y por lo tanto podrían caer dentro de la materia no considerada como invención mencionada en el 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones.

La reivindicación 8 reclama secuencias de ADN aisladas que al usarlas juntas producen un diagnóstico amplicón para MON15985. En este caso, no se definen las secuencias reclamadas mediante sus características estructurales (secuencia nucleotidica) sino mediante el resultado a alcanzar. De esta forma no es posible efectuar una comparación de la materia reclamada con el estado de la técnica.

La reivindicación 11 reclama un método para detectar la presencia de MON15985. Además de los errores en la redacción de la cláusula, las etapas de seleccionar primers, ponerlos en contacto con el ADN a evaluar y amplificar son etapas de cualquier amplificación por PCR así que el método reclamado es tan general que resulta vago y especulativo a la vez que no es posible efectuar una determinación del estado de la técnica a partir de el.

La reivindicación 13 contiene términos que no son los correspondientes a la materia del área técnica, tales como "una probeta de nucleótidos" o "extringente". Además de ello, las etapas del método reclamado son las etapas de cualquier método de hibridización en las cuales no se han definido ni las sondas (mediante una secuencia) ni las condiciones a las cuales se efectúa dicha hibridización. Las sondas se definen por el resultado esperado, pero no por sus características propias, como para que pudiesen ser consideradas como elementos diferenciadores del método que se reclama. Así que, el método en mención podría ser cualquiera de los existentes en el estado de la técnica y de esta forma la cláusula resulta tan amplia que no es posible efectuar una determinación del estado de la técnica más cercano.

El kit reclamados en las cláusulas 14 no define los elementos que lo componen mediante sus características propias si no por el resultado esperado cómo es que se

unan a determinadas secuencias. Por otra parte, la selección de los primers de 10 nucleótidos, comprendidos por el kit de la reiv. 15, dentro de secuencias de 2267 o 1340 nucleótidos resulta en miles de pares de cebadores diferentes que el solicitante ni siquiera ha divulgado. Así que la reclamación de un kit con elementos indefinidos y caracterizados por el resultado a alcanzar es amplia, especulativa y no permite determinar con exactitud cual es la materia a proteger.

De acuerdo con lo anterior, las reivindicaciones 5, 8, 11, 13, 14 y 15 no cumplen con el requisito de claridad definido en el artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones.

Es una invención:

El artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "No se consideran invenciones: a) los descubrimientos, las teorías científicas y los métodos matemáticos; b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural; c) las obras literarias y artísticas o cualquier otra protegida por el derecho de autor; d) los planes, reglas y métodos para el ejercicio de actividades intelectuales, juegos o actividades económico-comerciales; e) los programas de ordenadores o el soporte lógico, como tales; y, f) las formas de presentar información."

Las reivindicaciones 6 a 8 reclaman secuencias de ADN aisladas, que constituirían materia existente en la naturaleza y por ende que no puede ser considerada invención a la luz del literal b) del artículo 15 de la Decisión 486.

Excepciones de Patentabilidad:

El artículo 20 de la Decisión 486 se establece: "No serán patentables: a) las invenciones cuya explotación comercial en el territorio del País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger el orden público o la moral. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria al orden público o a la moral solo debido a la existencia de una disposición legal o administrativa que prohiba o que regule dicha explotación; b) las invenciones cuya explotación comercial en el País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger la salud o la vida de las personas o de los animales, o para preservar los vegetales o el medio ambiente. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria a la salud o la vida de las personas, de los animales, o para la preservación de los vegetales o del medio ambiente sólo por razón de existir una disposición legal o administrativa que prohiba o que regule dicha explotación; c) las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos; d) los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales."

Las reivindicaciones 1 a 4 se refieren a plantas de algodón resistentes a insectos y a sus semillas, las cuales por encontrarse dentro del alcance de la literal c) del artículo 20 se encuentran exceptuadas de patentabilidad.

Lo mismo sucedería con el método reclamado en la cláusula 5, donde al parecer se reivindica un cruce entre plantas el cual implica necesariamente la etapa de reproducción que constituye un procedimiento esencialmente biológico, y por lo tanto no sería patentable a la luz del literal C del artículo 20 de la Decisión 486.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta

subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

DORIS ELENA POLO CORDOBA
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E).

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 25 MAYO 2006

CONCEPTO TÉCNICO N°: 720	**EXAMINADOR TÉCNICO Código N°: 202063**	**2006-05-04**

CAVELIER
ABOGADOS

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

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

269 273 268

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 02-049630- -00007-0000
Fec: 2006-08-24 16:57:03 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 467 SOLICIPRORROGA Folios: 2

TRAMITE: 002
EVENTO: 001
ACTUACION: 467

Referencia	:	Expediente 02049630
Asunto	:	Solicitud de patente para: **PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON1598, COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DEL MISMO**
Solicitante	:	**MONSANTO TECHNOLOGY LLC**
Fecha de Solicitud	:	11 de Junio de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante, en el asunto antes identificado, atentamente solicito a Usted se sirva concederme un plazo de treinta (30) días, para atender el oficio No. 5591 notificado por fijación en lista 25 de mayo de 2006.

2. Presento con este memorial, el recibo expedido por el Fondo Especial de la Superintentencia de Industria y Comercio, en donde costa el pago hecho por valor de $69.000 en conformidad con lo dispuesto en la resolución No. 35582 del 28 de diciembre de 2005.

Bogotá,
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
JDF/JDF/ID-000039/WPC12746
Cns M-2006-00009363

270
269

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 02-049630- -00007-0000
Fec: 2006-08-24 16:57:03 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 467 SOLICIPRORROGA Folios: 2

UPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 58,030
HA : AGOSTO 1 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
IER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55274906	01/08/2006	41,992,000.00

***** C O N C E P T O *****

T. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	31 PRORROGA DE TERMINOS	69,000.00
	TOTAL : $	69,000.00

SON: SESENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____ Cob 12746-801-002-1

Por otro lado, la presencia del segundo transgen también ayuda a reducir la probabilidad de desarrollo de una peste de insectos que sea resistente a proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*. Así, es claro que la planta de algodón resistente a los insectos utilizada para el cruce es una nueva planta de algodón que posee resistencia mejorada a los insectos.

Adicionalmente, el método de la reivindicación 7 también se relaciona con la etapa de seleccionar la progenie que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID Nos: 14-18 cuya secuencias son nuevas secuencias de unión de ADN genómico-transgénico debido a la inserción transgénica.

Dichas secuencias de unión no se presentan naturalmente ya que la inserción de transgenes *cry*I Ac y *cry*2AB en el genoma de una planta no ocurre de forma natural. Por lo tanto, la reivinciación 7 hace referencia a un método novedoso e inventivo y no a un proceso esencialmente biológico.

Antigua reivindicación 8

La reivindicación 8 ha sido eliminada. Las nuevas reivindicaciones 8-11 están dirigidas a moléculas de ADN aisladas caracterizadas por secuencias específicas, es decir, definiendo las características estructurales.

Antigua reivindicación 11

La antigua reivindicación 11 corresponde a las nuevas reivindicaciones 12 y 13 donde el paso (c) especifica lo que esta siendo detectado. Es decir, al hacer referencia específica al par iniciador utilizado para la amplificación del ADN así como el amplicon que está siendo detectado las nuevas reivindicaciones 12 y 13 caracterizan específicamente los métodos para la detección de la presencia de la inserción de MON15985 en los tejidos de algodón.

Antigua reivindicación 13

La antigua reivindicación 13 corresponde a la reivinciación 15. Así, la novedad y el nivel inventivo del método reivindicado depende de la sonda de polinucleotidos que hibridiza a una o más secuencias de unión específicamente identificadas que son diagnóstico para el evento MON15985. De acuerdo con lo anterior, es obvio para una persona versada en la materia que una sonda de polinucleotidos que hibridiza bajo condiciones de hibridización severas con una o más secuencias

de unión tendría una secuencia que es complementaria con una o más secuencias de unión de tal forma que la sonda de polinucleotidos está definida por sus propias características.

Reivindicación 14

La antigua reivindicación 14 corresponde a la nueva reivindicación 16. Esta reivindicación revela un kit que comprende una sonda de polinucleótido. Dicha sonda, está definida adicionalmente como aquella que hibridiza bajo condiciones severas de hibridización con una o más secuencias de unión. Como se indicó anteriormente, dicha sonda tendría una secuencia que es complementaria con una o más secuencias de intersección y que se define de forma inequívoca. De tal forma que la nueva reivinciación 16 se encuentra definida por los elementos que la constituyen.

Reivindicación 15

La nueva reivindicación 17 corresponde a la antigua reivindicación 15 y se refiere a un kit que comprende una molécula de ADN aislada que tiene al menos quince nucleótidos de las secuencias SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12 o sus complementos y una secuencia de unión entre el ADN de inserto y de flanqueo de MON15985. Adicionalmente quiero poner de presente que esta reivindicación define con mayor claridad el alcance de la invención que la antigua reivindicación 15.

En conclusión, las secuencias SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO:12 delinean los extremos 5' y 3' respectivamente del inserto en el evento de algodón MON15985 o MON15985X y que además incluye el ADN el cual inmediatamente rodea el inserto en ambos extremos. La SEQ ID NO: 11 comprende la secuencia de intersección de SEQ ID Nos: 14-16 en un cierto orden mientras que la SEQ ID NO:12 comprende las secuencias de intersección de SEQ ID Nos: 17-18.

Para estos efectos, adjunto copia de la FIG 1 modificada en la cual se establece la relación entre dichas secuencias.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, quiero poner de presente que las nuevas reivindicaciones establecen un alcance totalmente sustentado en la descripción y por lo tanto, la patentabilidad de la presente invención se basa en la patentabilidad de las secuencias de unión y amplicon que son únicas para el evento MON15985.

CAVELIER
ABOGADOS

271
272

4.3. Invenciones

Las reivindicaciones 6 y 8 corresponden a las nuevas reivindicaciones 8-11 las cuales están dirigidas a moléculas de ADN aisladas que comprenden uno o más secuencias de unión y/o una secuencia del amplicon total o parcialmente larga (o su complemento). Como se indicó anteriormente, las secuencias de unión de la SEQ ID Nos 14-18 y las secuencias del amplicon de SEQ ID Nos 11 y 12 no son secuencias que se presentan de forma natural sino que por el contrario son secuencias para el evento MON15985. Dicho evento incluye modificaciones genéticas y no se presenta de forma natural.

En conclusión, las nuevas reivindicaciones están dirigidas a moléculas aisladas de ADN que no existen en la naturaleza y por lo tanto deben ser consideradas como materia patentable.

Teniendo en cuenta que de esta manera he atendido a cabalidad las objeciones planteadas por su Despacho a la presente solicitud de patente respetuosamente solicito que se otorgue el privilegio de protección de patente.

5. DOCUMENTOS ADJUNTOS: Junto con este memorial presento los siguientes documentos:

5.1. Formulario de modificaciones
5.2. Recibo de pago por valor de $95.000
5.3. Nuevo capítulo reivindicatorio
5.4. Nueva Figura 1

Bogotá,
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
JDF/JDF/
ID-000040/WPC12746
Cns M-2006-00010875

CAVELIER
ABOGADOS

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

60

CAVELIER
ABOGADOS

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

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 02-049630- -00008-0000
Fec: 2006-10-04 16:51:55 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 13

Señora Jefe de la

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Trámite: **002**
Evento: **001**
Actuación: **444**

Referencia	:	Expediente No. 02049630
Asunto	:	Solicitud de patente para: **PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO**.
Solicitante	:	**MONSANTO TECHNOLOGY LLC**
Fecha de Solicitud	:	11 de Junio de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al oficio número 5591 notificado por fijación en lista el 25 de Mayo de 2006.

2. Mediante memorial radicado el 17 de agosto de 2006 solicité un plazo de treinta (30) días para dar respuesta al oficio No.5591, previo pago de la tasa correspondiente.

3. Mediante el oficio número 5591 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre el examen de fondo de la presente solicitud de patente:

4. Atiendo a las observaciones realizadas mediante el oficio número 5591 de la manera siguiente:

En primer lugar, presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por diecisiete (17) reivindicaciones en el cual se ha delimitado claramente la materia reivindicada, con el fin de superar las objeciones efectuadas por el Examinador. Sin embargo, antes de demostrar cómo se han superado dichas objeciones, procederé a referirme a la materia reivindicada en cada una de las nuevas reivindicaciones:

4.1. **Nuevo pliego reivindicatorio.**

Reivindicaciones 1-6

Las reivindicaciones 1-6 están dirigidas a células vegetales de algodón resistente a los insectos. En particular, la nueva reivinciación 1 se refiere a una célula vegetal de algodón resistente a los insectos la cual se ha depositado con la **American Type Culture Collection** bajo el número de acceso PTA-2516. Así mismo, la reivindicación 2 se refiere a una célula vegetal de algodón resistente a los insectos que tiene un genoma que comprende un inserto de ADN que codifica para Cry2Ab y une el ADN que tiene las secuencias SEQ ID Nos: 14-18.

Por otro lado, la reivindicación 3 se refiere a una célula vegetal de algodón con un genoma que comprende un inserto de ADN que codifica para CRy2AB y ADN y que tiene las secuencias de nucleótidos SEQ ID Nos: 11 y 12.

La reivindicación 4 limita la célula vegetal de algodón de las reivindicaciones 2 o 3 a aquella en donde el ADN genómico es capaz de producir al menos un amplicon de al menos 1.5 Kb cuando se utilizan iniciadores con las secuencias SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36. Así mismo las reivindiciaciones 5 y 6 dependientes de la reivinciación 4 se refieren a células homocigotas y heterocigotas respectivamente.

Reivindicación 7

La reivindicación 7 está dirigida a un método para producir una planta de algodón resistente a los insectos donde una de las plantas utilizadas para el cruce así como la progenie derivada del cruce comprende las secuencias de nucleótidos SEQ ID Nos 14-18.

Reivindicaciones 8-11

Las reivindicaciones 8-11 están dirigidas a una molécula de ADN aislada que comprende varias secuencias. Las secuencias reivindicadas comprenden nuevas secuencias de unión de ADN que no fueron reveladas con anterioridad. Estas nuevas secuencias se pueden utilizar como iniciadores o sondas con el propósito de detectar el evento MON15985.

Reivindicaciones 12-15

Las reivindicaciones 12-15 están dirigidas a métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 mediante la detección de la presencia de un amplicon que es diagnóstico para el evento MON15985 o mediante la detección de la hibridización de una sonda a una muestra de tejido de algodón la cual hibridiza bajo condiciones de hibridización estrictas a una o más secuencias de unión.

Reivindicaciones 16 y 17

Las reivindicaciones 16 y 17 están dirigidas a un kit para la detección de ADN que comprende o un polinucleótido que hibridiza a una o más secuencias de unión o al menos 15 nucleótidos de las secuencias del amplicon o complementos de los mismos.

Una vez explicada, reivindicación por reivindicación, la materia objeto de la presente invención, procederé a referirme a cada una de las objeciones efectuadas por el Señor Examinador.

4.2. Claridad

Antigua reivindicación 5.

La nueva reivindicación 7 corresponde a la antigua reivinciación 5 se refiere a un método para producir una planta de algodón mediante el cruce de una planta resistente a los insectos que comprende las secuencias de nucleótidos SEQ ID Nos: 14-18 con otra planta de algodón obteniéndose al menos una progenie y luego seleccionar la progenie que es resistente a insectos y que comprende secuencias de nucleótidos SEQ ID Nos: 14-18.

De acuerdo a lo anterior, quiero poner de presente a su Despacho que el método reivindicado no es un proceso esencialmente biológico ya que se relaciona con un método específico de reproducción selectiva de plantas de algodón que comprenden el evento MON15985 y que por lo tanto no sucede de manera espontánea en la naturaleza.

Así, las plantas de algodón designadas como MON15985 contienen dos transgenes derivados de *B. thuringiensis, cry*LAc y *cry2*Ab. La presencia del gen *cry2*Ab en MON15985 (también conocido como "Bollgard II") mejora la efectividad de dicho algodón en contra de los insectos.

297
188
284

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 71,845
FECHA : SEPTIEMBRE 18 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 02-049630- -00008-0000
Fec: 2006-10-04 16:51:55 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 15

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48872310	18/09/2006	49,351,180.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	95,000.00
		TOTAL : $	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdo 12746-801-002-1

D1. 1AA 278 29T

EVALUATION OF BOLLGARDII® (CV. DP50BII) IN THE MISSISSIPPI DELTA: FIELD EFFICACY AGAINST VARIOUS LEPIDOPTERA WHILE PROFILING SEASON-LONG EXPRESSION OF CRY1Ac AND CRY2Ab

J. J. Adamczyk, Jr., K. Bew. L. C. Adams and D. D. Hardee
USDA-ARS
Stoneville, MS

Abstract

Transgenic cotton varieties (Bollgard® and BollgardII®) were evaluated in Stoneville, MS in 2000. It was apparent that the two protein product (BollgardII®) had increased activity against a multitude of lepidopteran pests compared to Bollgard®. Studies profiling the season-long expression of both proteins in BollgardII® indicated that the new protein (Cry2Ab) was expressed at a much higher level than Cry1Ac in Bollgard® and BollgardII®.

Introduction

Since transgenic Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) cotton (Bollgard®, Monsanto Co., St. Louis, Mo.) became widely commercialized in the US in 1996, growers and researchers have noted that many lepidopteran pests are not controlled with this technology alone. The addition of a second Bt protein (Cry2Ab) to Bollgard® (=BollgardII®) may offer additional control of various occasional and secondary Lepidoptera in cotton. The purpose of this research was to evaluate the efficacy of experimental transgenic cotton (BollgardII®) against various lepidopteran pests of cotton as well as to profile season-long expression of both proteins to aid in developing resistance-management strategies for this forthcoming technology.

Materials and Methods

Field Plots

Three varieties (conventional, cv. DP50, transgenic Cry1Ac Bollgard®, cv. DP50B; and transgenic Cry1Ac+Cry2Ab BollgardII®, cv. DP50BII) were planted in experimental plots on 23 May 2000 near Elizabeth, MS. Plots consisted of 4 rows (1.0 m centers) x 9.15 m treatments arranged in a randomized complete block design with each variety replicated twice in each block. Only insecticides not active on Lepidoptera were applied to all plots throughout the season as dictated by local management practices. Plots were irrigated twice.

Insects

To ensure that data would be generated for occasional lepidopterous pests of cotton, two colonies of armyworms were established. Larvae (ca. 300) of the fall armyworm (FAW), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), were collected from whorl-stage field corn near Stoneville, MS in April 2000 and reared for one complete generation in the laboratory as described by Adamczyk et al. (1998). Adult male beet armyworms (BAW), *Spodoptera exigua* (Hübner), were collected using pheromone traps located near Nopanee, MS in December 2000 and mated with a laboratory colony of females to establish a new colony suitable for field inoculations.

Inoculations of beet and fall armyworm egg masses to plants for all varieties were conducted in late July 2000. In brief, egg masses of either species were deposited on nylon cloth in the laboratory. An egg mass of equal size (ca. 2.54 cm² cloth sample) was stapled to the underside of a mature leaf with 4 replications/variety. For fall armyworms, each infested plot received 24 egg masses over a two-week period. For beet armyworms, each plot received 10 egg masses on July 17, 2000.

Reprinted from the *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*
Volume 2:835-837 (2001)
National Cotton Council, Memphis TN

Natural infestations of many lepidopterous species (BAW; FAW; tobacco budworm (TBW), *Heliothis virescens* (F); soybean looper (SBL), *Pseudoplusia includens* (Walker); salt marsh caterpillar (SMARSH), *Estigmene acrea* (Drury); bollworm (BW), *Helicoverpa zea* (Boddie) occurred in all plots. Scouting of whole plants and individual plant parts was conducted only in one replicated plot/block (4 replications/variety). Cotton was mechanically harvested for all rows in all plots and weighed.

Bt Quantification

For each sample date, a single terminal leaf was randomly harvested from 10 plants/plot for all varieties (4 replications/variety). Leaves were transported to the laboratory and within a few hours after being harvested, one sample (ca. 5-8 mg) was taken from each leaf using a standard 6-mm paper ticket punch. The leaf samples were weighed to accurately determine the amount of starting material, and combined for each variety into a 1.5 ml microcentrifuge tube containing extraction buffer (BaviroLogic, Inc.; Portland, ME). The tissue was then homogenized using a mini-beadbeater-8™ (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK.) using 6.4 mm steel ball bearings. To quantify the amount of Bt present for each variety (either Cry1Ac in DP50B or Cry1Ac and Cry2Ab in DP50BII), a commercial quantification plate kit was utilized as described in Adamczyk et al. (2000). For all sample dates, varieties were always identically compared in a side-by-side experiment. The proper standard curve, dilution factors, positive and negative controls, and calculations were conducted as dictated in the kit protocol.

Statistics

All means were log-transformed and analyzed using REML – ANOVA. The means were then separated using the LSMEANS option of PROC MIXED (Littell et al. 1996).

Results and Discussion

Drop cloth samples indicated that many lepidopteran pests were reduced in BollgardII® plots (cv. DP50BII) compared to Bollgard® (cv. DP50B) or conventional cotton (cv. DP50) (Table 1). In addition, very few fall armyworms were found in BollgardII® plots compared to Bollgard® or conventional cotton (Table 2). Because fall armyworms are primarily associated with flower damage and subsequent boll damage in Bollgard® cotton, BollgardII® may have increased efficacy against certain Lepidoptera that primarily feed on fruiting structures. The addition of Cry2Ab to Cry1Ac transgenic cotton could increase lepidopteran activity because of increased expression in reproductive tissues (Greenplate 2000). In the present study, the addition of Cry2Ab to transgenic cotton containing Cry1Ac significantly increased activity against pests such as SBL and to a lesser extent SMARSH, FAW, BAW, and BW. Activity against TBW remained superior (Table 3). However, no yield increase was observed with cv. DP50BII compared to cv. DP50B (Table 4).

The lepidopteran bioactivity and protein expression levels of Cry2Ab appear to be quite different than Cry1Ac. Sims (1997) noted that soybean loopers were highly sensitive (LC_{50} = 0.06 ug/ml) to purified Cry2A incorporated into artificial diet, while other studies have shown that they are not as sensitive to Cry1Ac in Bollgard® (Sumerford and Solomon 2000). Greenplate (2000) showed that Cry2Ab is less potent than Cry1Ac against TBW, but overall expression of Cry2Ab over Cry1Ac is 10 times higher. In our study, we also observed that Cry2Ab is expressed at a higher level than Cry1Ac throughout the growing season (Figure 1). Thus, depending on the species, the increased activity of BollgardII® compared to Bollgard® can be due to increased potency of Cry2Ab, increased overall expression level of Cry2Ab, or possibly a synergistic combination.

Achieving season-long dual-protein activity in BollgardII® will be a critical element in resistance management strategies for TBW and BW. Expression profiles of both proteins in BollgardII® appeared to be independent on one

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

another (Figure 1). Our data further indicated that the addition of Cry2Ab has no deleterious effect on levels of Cry1Ac in Bollgard II®. Because ev. DP50BII results from cloned plants regenerated from transformed tissue of ev. DP50B (Bollgard®), backcrosses with elite varieties will have to be conducted before commercialization. Thus, future research must be conducted to ensure that expression profiles of both proteins are adequate to provide season-long dual-protein activity against a multitude of Lepidoptera.

References Cited

Adamczyk, Jr., J. J., J. W. Holloway, G. E. Church, B. R. Leonard, and J. S. Graves. 1998. Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ-endotoxin. J. Econ. Entomol., 91: 539-545.

Adamczyk, Jr., J. J., D. D. Hardee, L. C. Adams, and D. V. Sumerford. 2000. Correlating differences in larval survival and development of bollworms (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworms (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1 A(c) δ-endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. J. Econ. Entomol. (in Press).

Greenplate, J. T., S. R. Penn, Z. Shappley, M. Oppenhuizen, J. Mann, B. Reich, and J. Osborn. 2000. Bollgard II® efficacy: quantification of total lepidopteran activity in a 2-gene product. pp. 1041-1043. *In* Proc. Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council, Memphis, TN.

Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. SAS system for mixed models. SAS Institute, Cary, NC.

Sims, S. R. 1997. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. Southwest. Entomol. 22: 395-404.

Sumerford, D. V. and W. L. Solomon. 2000. Growth of wild *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected from Bt and non-Bt cotton. Fla. Entomol. 83: 354-357.

Disclaimer

Mention of a commercial or propriety product does not constitute an endorsement by the U.S. Department of Agriculture for its use.

Table 1. Mean number of Lepidopteran found in Bollgard® and Bollgard II® plots using a 1.24 m^2 drop cloth.

	Mean for 3 drops/plot				
Variety	BAW	FAW	TBW	SBL	SMARSH
DP 50	42.00 a	3.00 a	7.00 a	32.00 a	8.75 a
DP 50B	35.50 a	1.75 a	0.25 b	37.75 a	2.75 a
DP 50BII	2.50 b	0.75 a	0 b	0.25 b	0.25 a
F-value	36.71	2.33	9.92	106.77	1.90
df	2, 9	2, 9	2, 9	2, 9	2, 9
P > F	<0.001	0.153	0.005	<0.001	0.205

Table 2. Mean number of fall armyworms found in Bollgard® and Bollgard II® flowers and whole plants.

	25 flowers/plot		10 Whole
Variety	White Flowers	Pink Flowers	Plants
DP 50	1.50 a	2.25 a	2.75 a
DP 50B	0.25 a	0.75 ab	2.50 ab
DP 50BII	0.25 a	0 b	0.25 b
F-value	1.13	6.14	4.25
df	2, 9	2, 9	2, 9
P > F	0.368	0.021	0.050

Table 3. Cumulative percent reduction, relative to DP50, of larvae found in field plots of Bollgard® and Bollgard II® cotton in Stoneville, MS 2000.

Species	DP50B	DP50BII
BW	57.0	86.0
TBW	99.9	99.9
SBL	0	99.0
FAW	20.0	87.0
BAW	30.0	86.0
SMARSH	29.0	97.0

Table 4. Mean number of damaged plant parts and yield in Bollgard® and Bollgard II® plots.

Variety	Squares[1]	25 Pink Flowers[2]	Bolls[3]	Yield[4] (lbs/A)
DP 50	7.75 a	7.75 a	22.5 a	872 a
DP 50B	6.25 a	6.50 a	1.0 b	1182 b
DP 50BII	0.75 a	3.50 b	0.25 b	1172 b
F-value	2.17	5.18	54.55	9.10
df	2, 9	2, 9	2, 9	2, 21
P > F	0.170	0.032	<0.001	0.001

[1]Damage significant to cause fruit loss. 10 whole plants/plot.
[2]Lepidopterous feeding on bracts or petals. 25 flowers/plot.
[3]Damage significant to cause fruit loss. 20 whole plants/plot.
[4]Based on 35% gin turnout.

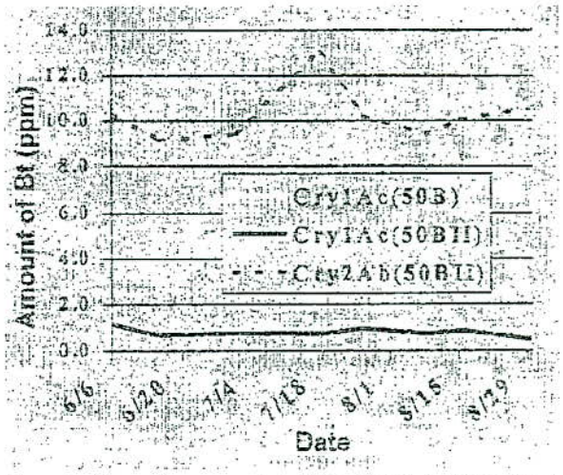


Figure 1. Season-long expression of Bt protein(s) in Bollgard® and Bollgard II®.

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

D4.

280

293

EFFICACY OF BOLLGARD AND BOLLGARD II COTTONS AGAINST BOLLWORM, *HELICOVERPA ZEA* (BODDIE) IN FIELD AND GREENHOUSE STUDIES

R. E. Jackson, J. R. Bradley, Jr., J. W. Van Duyn and A. D. Burd
North Carolina State University
Department of Entomology
Raleigh, NC

Abstract

Bollgard™ and Bollgard II™ cottons, along with the conventional sister line, were evaluated in field and greenhouse experiments with respect to efficacy against bollworm in North Carolina in 2000. Field studies were proposed to resolve the question of increased efficacy of Bollgard II over Bollgard on bollworm, as well as to determine survivorship parameters of bollworm on each cotton genotype. The impact of supplemental bollworm control on yield was evaluated at field sites. A greenhouse study was designed to determine the efficacy of three *Bacillus thuringiensis* Berliner (*B. t.*) cotton genotypes on a field-collected bollworm strain and a Cry1Ac-tolerant bollworm strain that had been selected for tolerance to the Cry1Ac toxin in the laboratory for two generations. Results from field studies indicated that although DP50BX (Bollgard II) illustrated no significant effects on larval survival beyond that of DP50B (Bollgard), a significant reduction in the level of fruit damage sustained by DP50 and DP50B was observed for the stacked-gene line. Yield response to supplemental pyrethroid oversprays varied among test sites due to differing bollworm infestation levels and moderate levels of boll rot. Greenhouse study results suggested that DP50BX was equally effective in reducing numbers of both the Cry1Ac-tolerant and susceptible bollworm larvae, as well as surface-damaged and penetrated fruit below that of DP50B.

Introduction

The commercialization of Bollgard™ (Monsanto Agric. Co., St. Louis, MO) cottons has provided growers with an excellent alternative for controlling lepidopteran pests. However, reports from Stone and Sims (1993) indicated that *B. t.* endotoxins were much less effective in controlling bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), than the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fab.). Results from field trials conducted in North Carolina verify that Bollgard cottons could sustain significant fruit damage and yield losses, thus creating the need for supplemental insecticide oversprays for bollworm (Burd et al. 1999; Lambert et al. 1996, 1997; Mahaffey et al. 1994, 1995). This is most likely caused by the observed drop in average levels of Cry1Ac endotoxin (Greenplate 1999; Greenplate et al. 1998) which coincides with the major bollworm flight in North Carolina. With the bollworm population receiving a sublethal dose of Cry1Ac, the "high dose strategy" for insect resistance evolution is violated by Bollgard cottons, which institutes a need for new technological developments.

Bollgard II™ cottons produce two proteins, Cry1Ac and Cry2Ab, that are active against bollworm. The novel dual-gene line illustrates approximately the same level of expression of the Cry1Ac endotoxin as the Bollgard varieties (Greenplate et al. 2000). Greenplate also reported that the Cry2Ab endotoxin is expressed at a much higher level than Cry1Ac in the Bollgard II line. The dual-gene construct, therefore, would more appropriately fit the "high dose strategy" for insect resistance evolution than would the currently utilized single-gene construct. Reports from field and greenhouse trials conducted in North Carolina demonstrated that Bollgard II genotypes significantly reduced numbers of susceptible and Cry1Ac-tolerant bollworm larvae below that of the Bollgard cottons (Jackson et al. 2000). This suggests that the implementation of Bollgard II cottons could possibly extend the time frame for bollworm resistance evolution beyond that of current Bollgard varieties.

Reprinted from the *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*
Volume 2:815-819 (2001)
National Cotton Council, Memphis TN

Results from field and greenhouse trials evaluating the efficacy of Bollgard and Bollgard II cottons and the conventional sister line by measuring bollworm numbers, fruit damage, and yield under pyrethroid treated and untreated systems are reported herein.

Materials and Methods

Field Studies

Experiments were conducted at the Central Crops Research Station, Johnston Co., NC, the Upper Coastal Plain Research Station, Edgecombe Co., NC, and the Tidewater Research Station, Washington Co., NC, in 2000. Each test site consisted of a randomized complete split-plot design with four replicates. Whole plots were 16, 20, and 24 rows by 60 feet for DP50, DP50B, and DP50BX, respectively, at each location. Different plot sizes were chosen for determination of the survival of bollworm in each genotype through mass sampling procedures in which large numbers of bolls were examined for each genotype to estimate bollworm survival on a per acre basis for making resistance management decisions and estimating refuge requirements. Subplots consisted of 12, 16, and 20 untreated rows for DP50, DP50B, and DP50BX, respectively, and 4 rows that were treated with a pyrethroid as required for supplemental bollworm control. Yield differences between pyrethroid-treated and untreated subplots were determined for each site.

Cotton genotypes DP50, DP50B, and DP50BX were planted on 15 May in Edgecombe Co., 17 May in Johnston Co., and 18 May in Washington Co. Aldicarb (Temik 15G, Aventis CropScience, Research Triangle Park, NC) was applied in-furrow at planting at 5.0 lb. a. i./acre for control of early season insect pests. Acephate (Orthene 97, Valent USA Corp., Walnut Creek, CA) was applied at 0.75 lb. a. i./acre as a mid-season overspray for stink bugs and plant bugs, as well as to eliminate arthropod predators. Two applications of lambda cyhalothrin (Karate Z 2.08 CS, Zeneca Inc., Wilmington, DE) were made to appropriate subplots for supplemental bollworm control at Johnston and Edgecombe counties on 19 July and 7 August, as well as at Washington Co. on 27 July and 9 August. Fertilization, plant growth regulation, weed control, and defoliation were accomplished as recommended by North Carolina State University.

Terminal region assessments of bollworm eggs, live larvae, and damage were made the weeks of 30 July and 6 August by the random sampling of 25 terminals per plot. Square evaluations for live larvae and damage were made the weeks of 6 and 13 August by examination of 50 squares per treatment per replicate. Boll assessments for live larvae and damage were made the weeks of 13, 20, and 27August, as well as 3 September by examination of 50 bolls per treatment per replicate. Bollworm egg, live larvae, and damage numbers per treatment per replicate were converted to percentages prior to analysis. Yields were determined by harvesting two center rows of each subplot with a mechanical cotton picker on 30 October at Edgecombe Co. and 7 November at Johnston and Washington counties. Yields were converted to lb. seed cotton per acre prior to analysis.

The total numbers of fourth to fifth instar larvae, harvestable bolls, and damaged harvestable bolls were counted in a randomly selected area of five row feet per treatment per replicate at the Edgecombe and Washington county sites on three sample dates (24 and 31 August and 7 September). Large larvae, fourth and fifth instars, were transported to the laboratory and reared on bolls from the respective genotypes until the prepupal stage. Prepupae were then placed into 30 ml plastic cups containing non-*B. t.* artificial diet which served as a substrate to tunnel into for pupation. Numbers of successfully emerged adults from each genotype were counted and converted to a per acre basis prior to analysis along with total numbers of harvestable bolls, damaged bolls, and live larvae. These numbers provide an estimation of survival parameters of the bollworm, which is important in resistance management.

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Greenhouse Study

An experiment was conducted in a greenhouse chamber at the Tidewater Research Station, Washington Co., NC. The test was a randomized complete block design with seven replicates. Each replicate consisted of 12 plants, two plants per treatment combination of cotton genotype and bollworm strain. Plants within blocks were separated by a distance of two feet, whereas, blocks were separated by a 3 foot space on tables.

Cotton genotypes DP50B, DP50X, and DP50BX were planted in three gallon pots at one plant per pot on 27 June. Arthropod natural enemies, as well as aphids and whiteflies, were eliminated by side-dressing cotton plants two weeks prior to bollworm infestation with Aldicarb to achieve a rate of 0.75 lb. a. i./acre. Fertilization and plant growth regulation were provided as recommended for greenhouse cotton plants.

Local bollworm adults were collected from light traps and nets in the laboratory for egg collection. Neonate larvae from the eggs were used as the control strain in the experiment. A Cry1Ac-tolerant strain of bollworm was originally collected from light traps and selected for tolerance to the Cry1Ac toxin (MVP) in artificial diet for two generations. Infestation of five neonate larvae onto fruiting structures on respective plants from each genotype using a fine-haired artist paint brush occurred when cotton plants reached approximately 100 days. Assessments of surviving larvae, superficial fruit damage, and fruit penetration were made by whole plant examination at 14 and 21 days after infestation. Surviving larvae from the last evaluation were taken to the laboratory and placed into 30 ml plastic cups containing non-*B. t.* artificial diet which served as a medium for larvae to tunnel into for pupation. Numbers of bollworm that successfully pupated and those that successfully emerged as adults were recorded and converted to percentages.

Data Analysis

All data were subjected to ANOVA using PROC GLM (SAS Institute 1990), and means for each treatment were separated ($P<0.05$) using Fisher's Least Significant Difference test or LSMEANS in SAS.

Results

Field Studies

No differences were found among the three cotton genotypes with distribution of bollworm eggs in cotton terminals being consistent across field sites (Table 1). No significant differences were evident between DP50BX and DP50B with respect to percent live bollworm larvae in cotton terminals, and both Bollgard genotypes reduced percent bollworm larvae below that of the conventional variety (Table 1). Percent terminal damage was significantly lessened by both Bollgard genotypes compared to the conventional variety with DP50BX further reducing percent terminal damage below that of DP50B (Table 1). Square evaluations revealed that Bollgard cottons did not differ with respect to the percentage of squares containing live bollworm larvae, but both contained a significantly lower percentage of live larvae than the conventional variety (Table 2). Data in Table 2 also show a significant reduction in percent bollworm damaged squares by both Bollgard genotypes compared to the conventional variety with DP50BX further reducing square damage below that of DP50B. Boll evaluations indicated that Bollgard cottons did not differ with respect to percent live bollworm larvae in bolls but significantly lessened percent live bollworm larvae compared to the conventional variety (Table 2). However, Table 3 indicates that DP50BX sustained less boll damage than DP50B at each test site with both Bollgard cottons having less boll damage than the conventional variety.

Field evaluations for determination of total harvestable fruit on a per acre basis revealed that the conventional variety had a significantly lower number of bolls than the Bollgard cottons (Table 4). Results in Table 4 also indicate that the Bollgard cottons had significantly fewer numbers of damaged bolls than the conventional variety in which greater than half the bolls were bollworm damaged. Table 5 illustrates that no differences were evident between Bollgard genotypes with respect to the number of surviving fourth to fifth instar bollworm larvae per acre. However, only DP50BX contained a significantly lower number of larvae per acre compared to the conventional variety. The number of large larvae per acre closely relates to the number of successfully emerged bollworm adults on a per acre basis which was much lower in the Bollgard genotypes than in the conventional variety (Table 5). Differences in number of successfully emerged bollworm adults were not evident among Bollgard cottons even though successful emergence was much lower numerically in DP50BX than in DP50B.

Yield differences measured in pounds of seed cotton per acre between pyrethroid-treated and untreated subplots in three cotton genotypes varied among test sites. Pyrethroid treated and untreated subplots did not differ significantly with respect to yield in lb. seed cotton per acre at the Central Crops Research Station (Table 6). Cotton genotype also had no impact on yield at this site. Results in Table 7 reveal a genotype*insecticide interaction at the Upper Coastal Plain Research Station in which all treatment combinations were compared. Yield benefits from pyrethroid applications were only evident in the conventional variety. Both untreated Bollgard genotypes illustrated significantly improved yields compared to the untreated conventional variety. Among pyrethroid-treated subplots, DP50B produced more seed cotton than DP5CBX. Neither pyrethroid treated Bollgard variety differed from the treated conventional variety. At the Tidewater Research Station, pyrethroid-treated subplots averaged across cotton genotypes produced significantly higher yields than untreated subplots (Table 8). Yields in lb. seed cotton per acre averaged across subplots were higher in DP50BX than DP50B, which also out-yielded the conventional variety.

Greenhouse Study

The Cry1Ac-tolerant bollworm strain displayed a significantly higher percent larval survival than the susceptible bollworm strain on DP50B, but no differences among larval strains were evident for the DP50X and DP50BX genotypes (Table 9). As with larval survival, Table 10 indicates that the Cry1Ac-tolerant bollworm strain caused a significantly higher percent surface-damaged fruit than did the susceptible bollworm strain in DP50B only. Bollworm strains did not differ with respect to percent surface damaged fruit within genotypes DP50X and DP50BX. Data in Table 11 indicate that the percentage of penetrated fruit averaged across cotton genotypes was significantly higher for the Cry1Ac-tolerant strain compared to the susceptible strain. Although no differences in percent penetrated fruit existed between DP50X and DP50BX, only DP50BX significantly reduced the percentage of penetrated fruit below that of DP50B. The percentage of larvae from the Cry1Ac-tolerant bollworm strain that developed on DP50B and successfully pupated was 4.29%. No other larvae on any genotype survived until pupation. Of those that pupated, 66.7% successfully emerged as adults.

Discussion

Field Studies

Bollworm populations varied spatially in 2000, with an uncharacteristically low population at the Central Crops Research Station and moderate to high infestations at the Upper Coastal Plain and Tidewater Research Stations. In field studies, both DP50B and DP50BX provided similar levels of bollworm control with respect to percent live bollworm larvae in terminals, squares, and bolls, with both transgenic cultivars reducing larval numbers below that of the conventional variety. The DP50BX line, however, was more effective in sustaining less fruit damage than DP50B in these plant regions. Significantly less fruit damage should have equated to higher yields, but moderate levels of boll rot penalized the better treatments, rendering some possible yield differences inseparable. Both transgenic

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

cottons out-performed DP50 with respect to production of total and damaged harvestable bolls per acre, as well as successfully emerged bollworm adults per acre. Only DP50BX contained significantly lower numbers of large live larvae than the conventional variety. Cotton genotypes DP50B and DP50BX also performed similarly with respect to production of total and damaged harvestable bolls per acre, as well as numbers of large live larvae and successfully emerged adults per acre. However, numerical reductions made by DP50BX in numbers of bollworm that successfully completed development may extend the time frame for bollworm resistance evolution but possibly for a shorter time period than originally expected.

Greenhouse Study

The Cry1Ac-tolerant bollworm strain out-performed the susceptible strain with respect to larval survival and surface damage inflicted onto fruiting structures, which was largely due to the increased performance of the Cry1Ac-tolerant strain compared to the susceptible strain on DP50B. Averaged across genotypes, increased fruit penetration by the Cry1Ac-tolerant bollworm strain over the susceptible strain was caused by the increased success of the Cry1Ac-tolerant strain on genotypes DP50B and DP50X. Fruit penetration by the Cry1Ac-tolerant strain on DP50BX was approximately 10X less than that of DP50X and DP50B, which is likely due to some additional effect of the two-gene construct versus that of the single-gene. Averaged across bollworm strains, DP50BX sustained less fruit penetration than DP50B. These results support reports from Jackson et al. (2000) indicating the increased bollworm control provided by Bollgard II lines over the commercial Bollgard variety with respect to larval survival and fruit penetration. In addition to larval survival and fruit penetration, the percentage of the Cry1Ac-tolerant bollworm strain that successfully pupated and emerged as adults was higher in DP50B (4.29 and 2.86%, respectively) than in DP50BX (0.00%) and DP50X (0.00%). These greenhouse data and those from field studies suggest that the commercialization of the dual-gene construct (DP50BX) would reduce bollworm damage over that experienced by Bollgard varieties, as well as eliminate the need for supplemental insecticide application for bollworm control. With the incidence of field resistance to Bollgard cottons in North Carolina (Jackson et al. 2000; Burd et al. 1999; Lambert et al. 1997, 1998; Mahaffey et al. 1994, 1995), the implementation of Bollgard II lines may also be necessary to provide control for that portion of the bollworm population already expressing resistance traits to Bollgard cottons.

Acknowledgments

The authors express appreciation to Cotton, Inc. for providing a graduate research assistantship for the senior author and to Monsanto Agric. Co. for providing partial project funding. Special thanks to Wayne Modlin, Andrew Summerlin, Phil Threatt, Tony Burd, and Brian Potter for technical assistance.

References Cited

Burd, T., J. R. Bradley, Jr., and J. W. Van Duyn. 1999. Performance of selected *Bt* cotton genotypes against bollworm in North Carolina. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 931-934.

Greenplate, J. T., S. R. Penn, Z. Shappley, M. Oppenhuizen, J. Mann, B. Reich, and J. Osborn. 2000. Bollgard II: efficacy: quantification of total lepidopteran activity in a 2-gene product. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 1041-1043.

Greenplate, J. T. 1999. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. J. Econ. Entomol. 92: 1377-1383.

Greenplate, J. T., G.P. Head, S. R. Penn, and V. T. Kabuye. 1998. Factors potentially influencing the survival of *Helicoverpa zea* on Bollgard cotton. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 1030-1033.

Jackson, R. E., J. R. Bradley, Jr., A. D. Burd, and J. W. Van Duyn. 2000. Field and greenhouse performance of bollworm on Bollgard II genotypes. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 1048-1051.

Lambert, A. L., J. R. Bradley, Jr., and J. W. Van Duyn. 1996. Effects of natural enemy conservation and planting date on the susceptibility of *Bt* cotton to *Helicoverpa zea* in North Carolina. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 931-935.

Lambert, A. L., J. R. Bradley, Jr., and J. W. Van Duyn. 1997. Interactions of *Helicoverpa zea* and *Bt* cotton in North Carolina. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 870-873.

Mahaffey, J. S., J. S. Bacheler, J. R. Bradley, Jr., and J. W. Van Duyn. 1994. Performance of Monsanto's transgenic *B. t.* cotton against high populations of lepidopterous pests in North Carolina. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 1061-1063.

Mahaffey, J. S., J. R. Bradley, Jr., and J. W. Van Duyn. 1995. *B. t.* cotton: field performance in North Carolina under conditions of unusually high bollworm populations. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. 795-798.

SAS Institute. 1990. SAS/STAT User's Guide, Vol. 2. SAS Institute, Cary, NC, 795 pp.

Stone, T. B. and S. R. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 86: 989-994.

Table 1. Mean (SE) percent bollworm egg, live larvae, and damage in the terminal region of three cotton genotypes averaged across three locations and two sample dates in North Carolina in 2000.

Genotype	Percent Egg	Percent Larvae	Percent Damage
DP50	8.00 (.018) a	4.25 (.006) a	15.92 (.019) a
DP50B	11.33 (.020) a	0.67 (.002) b	6.42 (.012) b
DP50BX	7.50 (.017) a	0.25 (.002) b	3.33 (.010) c

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 2. Mean (SE) percent live bollworm larvae in squares, square damage, and live bollworm larvae in bolls averaged across three locations and respective sample dates in North Carolina in 2000.

	Square Evaluations		Boll Evaluations
Genotype	Percent Larvae	Percent Damage	Percent Larvae
DP50	4.92 (.005) a	16.25 (.005) a	4.92 (.009) a
DP50B	0.42 (.002) b	3.33 (.004) b	1.00 (.003) b
DP50BX	0.00 (.000) b	0.25 (.001) c	0.17 (.001) b

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Table 3. Mean (SE) percent boll damage for each cotton genotype averaged across fo... sample dates for each test site in North Carolina in 2000.

Genotype	Central Crops Research Station	Upper Coastal Plain Research Station	Tidewater Research Station
DP50	12.50 (.008) a	49.25 (.030) a	44.25 (.037) a
DP50B	0.86 (.003) b	10.25 (.010) b	7.75 (.013) b
DP50BX	0.00 (.000) c	1.38 (.005) c	0.75 (.003) c

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 4. Mean (SE) number of total bolls and damaged bolls per acre for each cotton genotype averaged across three sample dates and two locations in North Carolina in 2000.

Genotype	Number of Bolls Per Acre	Number of Damaged Bolls Per Acre
DP50	311,817 (23,319) b	156,695 (24,328) a
DP50B	458,832 (12,637) a	27,830 (3,185) b
DP50BX	448,668 (18,047) a	7,502 (5,008) b

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 5. Mean (SE) number of live large bollworm larvae and successfully emerged adults per acre for each cotton genotype averaged across three sample dates and two locations in North Carolina in 2000.

Genotype	Number of Larvae Per Acre	Number of Emerged Adults Per Acre
DP50	6893 (1689) a	6893 (2,165) a
DP50B	3155 (816) ab	528 (197) b
DP50BX	1990 (1601) b	72 (72) b

Means within the same column or row followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 6. Mean (SE) weight of seed cotton in pounds per acre for pyrethroid treated and untreated subplots of each genotype at the Central Crops Research Station in North Carolina in 2000.

Genotype	Untreated	Treated
DP50	3,722 (193) a	3,618 (165) a
DP50B	4,107 (90) a	4,076 (84) a
DP50BX	4,055 (110) a	3,846 (135) a

Means within the same column or row followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 7. Mean (SE) weight of seed cotton in pounds per acre for pyrethroid-treated and untreated subplots of each cotton genotype at the Upper Coastal Plain Research Station in North Carolina in 2000.

Genotype	Insecticide	Pounds of Seed Cotton Per Acre
DP50B	Untreated	3,902 (240) a
DP50B	Treated	3,808 (108) ab
DP50BX	Untreated	3,624 (90) abc
DP50	Treated	3,452 (258) bc
DP50BX	Treated	3,230 (166) c
DP50	Untreated	1,440 (229) d

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, LSMEANS ($P \leq 0.05$).

Table 8. Mean (SE) weight of seed cotton in pounds per acre for pyrethroid-treated and untreated subplots of each genotype at the Tidewater Research Station in North Carolina in 2000.

Genotype	Untreated	Treated	Mean
DP50	1,399 (27)	2,083 (193)	1,741 (157) c
DP50B	2,455 (199)	2,474 (100)	2,465 (103) a
DP50BX	2,846 (131)	3,057 (90)	2,952 (84) a
Mean	2,233 (198) b	2,537 (140) a	

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 9. Mean (SE) percent surviving larvae for each bollworm strain within each cotton genotype averaged across two evaluation dates in the greenhouse in North Carolina in 2000.

Strain	DP50B	DP50X	DP50BX
Cry1Ac-tolerant Strain	5.00 (.022) a	0.71 (.007) a	0.00 (.000) a
Susceptible Strain	0.00 (.000) b	0.00 (.000) a	0.00 (.000) a

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 10. Mean (SE) percent surface-damaged fruit for each bollworm strain within each cotton genotype averaged across two evaluation dates in the greenhouse in North Carolina in 2000.

Strain	DP50B	DP50X	DP50BX
Cry1Ac-tolerant Strain	4.36 (.009) a	0.65 (.005) a	1.36 (.006) a
Susceptible Strain	1.19 (.006) b	0.00 (.000) a	1.36 (.006) a

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Table 11. Mean (SE) percent penetrated fruit for each cotton genotype and each bollworm strain averaged across two evaluation dates in the greenhouse in North Carolina in 2000.

Genotype	Cry1Ac-tolerant Strain	Susceptible Strain	Mean
DP50B	4.93 (.017)	0.85 (.005)	2.89 (.009) a
DP50X	4.10 (.020)	0.00 (.000)	2.05 (.010) ab
DP50BX	0.45 (.004)	0.00 (.000)	0.22 (.002) b
Mean	3.16 (.009) a	0.28 (.002) b	

Means within the same column or row followed by the same letter are not significantly different, Fisher's LSD ($P \leq 0.05$).

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Impact of Bt Cottons Expressing One or Two Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on Growth and Survival of Noctuid (Lepidoptera) Larvae

S. D. STEWART, J. J. ADAMCZYK, JR.,[1] K. S. KNIGHTEN, AND F. M. DAVIS

Department of Entomology and Plant Pathology, Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Mississippi State University, MS 39762

J. Econ. Entomol. 94(3): 752–760 (2001)

ABSTRACT A series of laboratory assays were performed to compare the relative impact of commercial and experimental cultivars of cotton, *Gossypium hirsutum* (L.), expressing zero, one, or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on several lepidopteran pests. Assays in which larvae were fed fresh plant tissue indicated that dual-toxin *B. thuringiensis* (Bt) cultivars, expressing both Cry1Ac and Cry2Ab endotoxins of *B. thuringiensis*, were more toxic to bollworms, *Helicoverpa zea* (Boddie), fall armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), and beet armyworms, *Spodoptera exigua* (Hübner), than single-toxin cultivars expressing Cry1Ac. Assays in which lyophilized plant tissue was incorporated into artificial diet also indicated improved activity of the dual-toxin Bt cultivar compared with single-toxin plants. Both bollworm and tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.), growth was reduced by Bt cotton, particularly the dual-toxin cultivar. Although assays with lyophilized tissues were done using largely sublethal doses, bollworm survival was reduced by the dual-toxin cultivar. It appears that this newly developed Bt cotton expressing two toxins will be more effective and have a wider range of activity on these lepidopteran pests.

KEY WORDS transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton, Cry1Ac, Cry2Ab, Lepidoptera, toxicity

TRANSGENIC BT COTTON, *Gossypium hirsutum* (L.), expressing the Cry1Ac insecticidal δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner, has been commercially available in the United States since 1996. Since then, *B. thuringiensis* (Bt) cotton has demonstrated remarkable control of some lepidopteran pests, particularly the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.), and the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). Since its release into commercial markets, Bt cotton seldom, if ever, has required supplemental insecticide control for these two pests (Williams 2000). Control of the bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), has been less dependable, and economically damaging infestations of this pest can occur on Bt cotton (Mahaffey et al. 1995), particularly after plants have begun flowering and when insecticides have disrupted populations of predators and parasites (Lambert et al. 1996, Turnipseed and Sullivan 1999). The bollworm is inherently more tolerant than tobacco budworm to the Cry1Ac δ-endotoxin expressed in currently available Bt cultivars (Luttrell et al. 1999). Additionally, low expression of the toxin in some plant parts, such as in pollen and petals, has been implicated in increased survival of the bollworms on Bt cotton (Adamczyk et al. 2000). Other common lepidopteran pests [e.g., fall armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith); beet armyworms, *Spodoptera exigua* (Hübner); and soybean loopers, *Pseudoplusia includens* (Walker)] are even more tolerant than bollworms to Cry1Ac (Luttrell et al. 1998, 1999).

One advantage of Bt cotton is that it greatly reduces injury and insecticide use associated with control of tobacco budworms and bollworms (Stewart et al. 1998). However, in low-spray environments, pests like soybean loopers, beet armyworms, and fall armyworms can potentially thrive, even in Bt cotton (Adamczyk et al. 1998, Ashfaq and Young 1999, Stewart et al. 2000). The insertion of an additional Bt gene encoding for a different toxin (Cry2Ab; Monsanto, St. Louis, MO) into current Bt cotton cultivars containing Cry1Ac may provide additional activity on certain lepidopteran pests and would improve the pest-control value of Bt cotton.

The potential impact on resistance management of cotton that expresses multiple toxins has been addressed (Tabashnik 1994, Sachs et al. 1996, Gould 1998). Mandating a refuge of non-Bt cotton as a source of susceptible individuals to mate with resistant insects has been the primary approach for preventing resistance to Bt cotton (Caprio 1994). This strategy relies on Bt cotton expressing a "high dose" (e.g., > 25 fold the LD_{99}) to lepidopteran pests so that survivors in Bt cotton are rare and heterozygous individuals are rendered functionally recessive (Gould 1998). This tactic has been criticized because commercially available Bt cottons do not appear to meet the high-dose criterion for bollworm as it presumably does for tobacco bud-

[1] Southern Insect Research Management Unit, USDA–ARS-MSA, P.O. Box 346, Stoneville, MS 38776.

0022-0493/01/0752–0760$02.00/0 © 2001 Entomological Society of America

ticidal
th and

298

DAVIS

eriment Station,

impact of
ero, one, or
s. Assays in
) cultivars,
bollworms,
myworms,
nich lyophi-
vity of the
budworm,
in cultivar.
rm survival
expressing
eran pests.

[redacted]city

l] are even more tol-
(Luttrell et al. 1998,

nat it greatly reduces
iated with control of
orms (Stewart et al.
vironments, pests like
orms, and fall army-
en in Bt cotton (Ad-
oung 1999, Stewart et
ldditional Bt gene en-
ry2Ab; Monsanto, St.
n cultivars containing
l activity on certain
nprove the pest-con-

ance management of
toxins has been ad-
s et al. 1996, Gould
Bt cotton as a source
ith resistant insects
for preventing resis-
). This strategy relies
dose" (e.g., > 25 fold
so that survivors in Bt
individuals are ren-
ould 1998). This tactic
mercially available Bt
ne high-dose criterion
loes for tobacco bud-

worm and pink bollworm. A potential advantage of having two Bt toxins expressed in cotton is that the risk of insect pests developing resistance to Bt cotton may be reduced, especially if resistance to one toxin does not confer resistance to the other.

Although not yet commercially available, transgenic cotton lines expressing two Bt toxins are under development. This article reports the results of laboratory assays with a dual-toxin Bt cotton (Cry1Ac and Cry2Ab) compared with single-toxin Bt cottons (Cry1Ac) and non-Bt cottons. Our primary objective was to compare the relative toxicity of single- and dual-toxin Bt cotton cultivars on tobacco budworm, fall and beet armyworm, and particularly bollworm. A secondary objective was to determine assay methods that are best suited for quantifying differences in the relative toxicity of Bt cottons.

Materials and Methods

Source of Plant Materials and Larvae Used in Assays. DPL50 (non-Bt), DPL50B (expressing Cry1Ac), and MON15985 and MON15813 (expressing Cry1Ac and Cry2Ab) were the primary, near-isogenic cultivars used in our assays. Other cultivars were used in some comparisons as indicated below. All cottons were Delta and Pine Land (Scott, MS) cultivars provided to the researchers in 1999 by the Monsanto. All plant materials used in fresh tissue assays were collected from field plots during 1999.

Fresh tissue assays with neonate and third-instar bollworms were done at the USDA-ARS-SIMRU (Southern Insect Management Research Unit, Stoneville, MS). All bollworms used in testing were from a colony created in the spring of 1999 when ≈300 individuals were collected from field corn near Stoneville, MS. The laboratory rearing of bollworms was conducted as described in Adamczyk et al. (1998), and the G_1 or G_2 generation was used in assays. Replicated field plots (Shelby, MS) containing DPL50, DPL50B and NuCOTN 33B (expressing Cry1Ac), and MON15985 and MON15813 (expressing Cry1Ac and Cry2Ab) were the source of plant tissue used in these experiments. In addition, replicated field plots (Elizabeth, MS) containing eight non-Bt and 17 Bt cotton cultivars were also used to make comparisons with dual-toxin Bt cotton. Field plots were maintained by standard agronomic practices for the region, including herbicide and nitrogen applications.

Assays using second-instar bollworm, beet armyworm, and fall armyworm were done at Mississippi State University (Mississippi State, MS). Additional experiments with neonate bollworm and tobacco budworm, using lyophilized leaf tissue, were also done at Mississippi State University. Larvae used were from the USDA-ARS-CHPRRU (Corn Host Plant Resistance Research Unit, Mississippi State, MS). These are long established colonies maintained as described by Davis (1989). Unless indicated, replicated field plots of DPL50, DPL50B, and MON15985 at Mississippi State University were used as a source of plant tissue in these assays. Field plots were established and maintained as described by Stewart et al. (2000).

285

When field plots were used as a source of plant material for assays, plant tissues were collected equally from insecticide-untreated replicates. Throughout all experiments, larvae were maintained at 28 ± 2°C, 70–80% RH, and a photoperiod of 14:10 (L:D) h.

297

Fresh Tissue Assays (Neonate Bollworm). To examine if dual-toxin Bt cotton (MON15813 and MON15985) was more toxic than single-toxin Bt cotton (17 different commercial cultivars expressing Cry1Ac) to neonate bollworms, leaves from plants in the fourth true leaf stages were harvested and fed to larvae in the laboratory. In addition, we used non-Bt commercial cultivars (8) as controls. Fully expanded leaves (15) were harvested from each replicate (four replicates per cultivar) with ≈0.5 cm of petiole remaining to prevent desiccation and transported to the laboratory in a cooler containing ice. Within 2 h of harvesting, a single leaf was placed into individual rearing cups (30 ml, JetPlastica, Hattisburg, PA), and a neonate bollworm was placed into each cup, which was then capped (60 neonates/cultivar). All cups were placed inside an autoclave bag (model 12 by 24 inches (30.5 by 61.0 cm), clear polyethylene; Fisher, Norcross, GA) to reduce leaf desiccation. Two days after exposure to cotton leaves, survival was recorded (i.e., movement present after disturbed with a camel's-hair brush). Fresh leaves, collected as before, were provided to larvae and this time. Survival was reassessed after two additional days.

Cry1Ac expression in flower parts is low compared with other plant parts (Adamczyk et al. 2000), and bollworms are commonly associated with flowers (J.J.A., unpublished data). Thus, a study was designed to examine if flower parts from the dual-toxin Bt cultivars were more toxic to neonate bollworms than flowers from single-toxin Bt cultivars. During the second week of flowering (peak flowering period), first position pink flowers were harvested from plots in Shelby, MS (three replicates), of NuCOTN 33B (expressing Cry1Ac) and MON15985 (expressing Cry1Ac and Cry2Ab) and transported to the laboratory within a cooler containing ice. To help make finding larvae easier, the petals were removed from the flowers. Within 2 h after harvesting, a single petal-less pink flower was placed into individual cups (30 ml), and two neonate bollworms were placed into each cup (60 flowers per cultivar, 120 neonates/cultivar). Survival was recorded at 2 d after larvae were infested onto the plant parts, and flowers were changed in cups containing live larvae, using flowers collected before. Survival was reassessed after two additional days. For the leaf and pink flower assays, mean survivorship was analyzed using analysis of variance (PROC REML-ANOVA, SAS Institute 1998), and means were separated via the lsmeans option of PROC Mixed (Littell et al. 1996). Numbers of live larvae were log transformed before analysis because treatment variances were not homogeneous.

Because it is widely believed that larvae move from flowers to bolls once flowers begin to desiccate, a study was designed to examine if increased efficacy on bollworm neonates was observed with dual-toxin Bt cotton on 1-d-old bolls. First position white flowers (30) from DPL50, NuCOTN 33B, and MON15985 plants were randomly tagged (Slant 'N Lock; A.M. Leonard, Piqua, OH [as described in Adamczyk et al. 1998]) in field plots at Shelby, MS. After 24 h, the 1-d-old bolls were removed from the plant and transported to the laboratory within a cooler containing ice. All remaining flower parts, including bracts and stems, were removed from the bolls, and the bolls were washed with distilled water and allowed to air dry. The bolls were then placed into individual cups (30 ml), and a single neonate was introduced. Survival of neonates was rated 4 d after they were infested onto plant parts and analyzed using PROC Freq with likelihood ratio chi-square (SAS Institute 1998). Survival differences among cultivars were separated using Fisher exact test (two-tailed) (Steel and Torrie 1980).

Fresh Tissue Assays (Second-Instar Bollworm, Beet Armyworm, and Fall Armyworm). Two similar methods were used to evaluate the relative toxicity of DPL50, DPL50B, and MON15985 on bollworm, fall armyworm, and beet armyworm. The two assay methods differed only in that in one method the insects were allowed to feed on plant tissue for 48 h and were then transferred to artificial diet (King and Hartley 1985), and in the other method, new plant tissue was provided to larvae every 48 h. Plant parts were collected from field plots, returned to the laboratory, washed with tap water, and air-dried before use in assays.

Second-instar larvae previously maintained on artificial diet (King and Hartley 1985) for 48 h posthatch were fed various plant parts. Bollworms and fall armyworms were given freshly picked white flowers because they primarily feed on fruiting structures. Beet armyworms were fed fully expanded leaves from the four to sixth node below the terminal because they are primarily leaf-feeders in cotton. Our assay method was similar to that of Chang et al. (2000). Approximately 0.5 cm of 2.0% sterile agar was poured into petri dishes (9 cm diameter), and autoclaved paper toweling was placed over the agar. This paper was cut to fit the bottom of the dishes and served as a wick for the moisture in the agar. The plant material was trimmed so that it would fit into the dishes and maintain contact with the toweling. The plant parts and one larva were placed in each dish, with the larvae placed on top of the plant tissue. Dishes were covered with corresponding lids. For each of the three species and cultivars, 60 larvae were tested. A few larvae escaped or were lost during the study, and these were omitted from analyses.

After 48 h, survival and the relative amounts of feeding damage (0–5 scale, no damage to total consumption) to the plant parts were recorded for each individual. Approximately one-half of the surviving insects were transferred to 30-ml plastic rearing cups (JetPlastica Co., Hattisburg, PA) containing ≈5.0 ml artificial diet. The remaining larvae were provided additional plant material at 48-h intervals until death or pupation. Survival was again determined 24 h later and subsequently at 48-h intervals until pupation. The lengths of larvae (mm) were recorded 5 and 7 d after their initial placement on plant tissue. Dates of pupation were also recorded for all surviving insects.

Our primary interest was to determine cultivar effects on the survival and growth of common lepidopteran pests such as bollworm, beet armyworm, and fall armyworm. Statistical comparison about how different plant parts influenced insect survival and development were not done because these experiments were not always done at the same time or with the same cohort of insects. Also, no attempt was made to statistically compare across species because different plant parts were used for testing. Besides cultivar effects, we also were interested in comparing the two assay methods (i.e., larvae transferred to artificial diet and those continually fed plant material). Thus, cultivar and assay methods were the two factors included in analysis. Each larva represented a replicate. Data for survival and the relative amount of feeding on plant tissue were categorical; therefore, we used categorical data analysis and protected lsmeans for separation of treatment effects (PROC Genmod, SAS Institute 1998). Cultivar effects on larval length and time to pupation were analyzed with ANOVA and using Student–Newman–Keuls for mean separations (PROC GLM, SAS Institute 1998).

Fresh Tissue Assays (Third-Instar Bollworm). Because bollworms may have the ability to survive on Bt cotton plant parts expressing low levels of Bt (i.e., flowers) or immigrate from non-Bt cotton, an experiment was designed to test the effect dual-toxin Bt cotton had on older bollworm larvae when fed 4-d-old bolls. First position white flowers were tagged in field plots at Shelby, MS, as previously described. After 4 d, the corresponding bolls (15, 25, and 35 for DPL50, NuCOTN 33B, and MON15985, respectively) were harvested. Bioassays were done as described for pink flowers except larvae were reared initially to the third instar on artificial diet (King and Hartley 1985), and only one larva was placed in each cup. Survival of neonates as well as number of bolls penetrated (i.e., penetration of boll wall to seed/fiber) were rated at 2, 4, and 6 d after infestation on plant tissue and analyzed using PROC Freq with likelihood ratio chi-square (SAS Institute 1998). Differences in survival among cultivars were separated using Fisher's exact test (two-tailed) (Steel and Torrie 1980).

Assays with Lyophilized Leaf Tissue (Neonate Bollworm and Tobacco Budworm). Bioassays using lyophilized leaf tissue that was incorporated into artificial diet were done with neonate tobacco budworms and bollworms to compare the sensitivity of these species to DPL50, DPL50B, and MON15985. In the first repetition of this experiment, done in 1999, 100 leaves located four to five nodes below the terminals were collected from the field plots at Mississippi State University. These leaves were collected when plants were near physiologic cutout (Harris et al. 1997). At

Table 1. Proportion of neonate bollworms surviving 2 and 4 d when fed cotton containing zero, one (Cry1Ac), or two Bt protein (Cry1Ac and Cry2Ab)

Plant part	Cultivars	Survival 2 d	Survival 4 d	n
Leaves[a]	Non-Bt[b]	0.96 ± 0.01a	0.92 ± 0.01a	48(
	Bt[c]	0.65 ± 0.03b	0.34 ± 0.03b	1,02(
	BtII[d]	0.39 ± 0.07c	0.07 ± 0.02c	12(
Pink flowers[e]	NuCOTN 33B[f]	0.72 ± 0.05a	0.48 ± 0.04a	12(
	MON15985[g]	0.55 ± 0.05a	0.18 ± 0.03b	12(
1-d-old bolls[h]	DPL50	—	0.83a	3(
	NuCOTN 33B[f]	—	0.10b	3(
	MON15985[g]	—	0.00b	3(

Analyses for leaves and pink flowers were done on number of surviving insects per replicate following log transformation (PROC Mixed Littell et al. 1996). Means ± SE within columns and plant parts not followed by a common letter are significantly different (lsmeans, $P < 0.01$) Data for 1-d-old bolls were analyzed with PROC Freq (SAS Institute 1998). Numbers not followed by a common letter are significantly differen [Fisher's exact test (two-tailed), $P < 0.05$, Steel and Torrie 1980]. *n*, Number of insects tested.

[a] ANOVA results: 2d-F = 44.4; df = 2, 102; $P < 0.01$. 4 d-F = 86.8; df = 2, 102; $P < 0.01$.

[b] Mean from eight commercial non-Bt cultivars, Elizabeth, MS.

[c] Mean from 17 commercial Bt cultivars (Cry1Ac), Elizabeth, MS.

[d] Mean from two experimental Bt cultivars, MON15813 and MON15985 (Cry1Ac and Cry2Ab), Shelby, MS.

[e] ANOVA results: 2d-F = 2.3; df = 1, 4; P = 0.21. 4d-F = 2.3; df = 1, 4; $P < 0.01$.

[f] Commercial Bt cultivar (Cry1Ac).

[g] Experimental Bt cultivar (Cry1Ac and Cry2Ab).

[h] Likelihood ratio chi-square (PROC Freq, SAS Institute 1998). χ^2 = 65.1, df = 2, $P < 0.01$.

physiological cutout, plants have a near maximum fruit load, resulting in slowed vegetative growth. Greenhouse-raised plants were used during the second repetition of the experiment, which was done in April 2000. Greenhouse plants, two per pot, were watered twice weekly and kept at 20–30°C without supplemental lighting. Plants were fertilized once (Osmocote 14-14-14, N:P:K, Scotts, Columbus, OH). Fifty fully expanded leaves per cultivar were collected from ≈50 preflowering plants. All leaves were returned to the laboratory, freeze dried, and stored at −80°C until use.

Lyophilized leaves were ground into a powder using a mortar and pestle. For each of the three cultivars, the tissue was incorporated into artificial diet using a high-speed blender. Sublethal doses (1.124, 11.24, 112.4, and 1124 μg plant tissue/ml diet) were used to compensate for the high susceptibility of these insects, particularly tobacco budworms, to Bt cotton. For each dose, and for both repetitions of the experiment, 96 tobacco budworm and bollworm neonates were individually placed in 5.0-ml wells containing ≈2 ml of treated diet. Trays containing 24 wells were covered with shrink wrap plastic and heat sealed. Survival of larvae was determined 3 and 7 d after infestation on diet. Larval length (mm) was measured at 7 d for six randomly selected larvae from each tray. Survival data were analyzed using PROC Genmod and lsmeans for separation of treatment effects (SAS Institute 1998). ANOVA was used to determine treatment effects on larval length, and Student–Newman–Keuls was used for mean separations (PROC GLM, SAS Institute 1998).

Results

Fresh Tissue Assays (Neonate Bollworm). Neonate bollworms were more susceptible to leaves and pink flowers from dual-toxin Bt cultivars (Cry1Ac and Cry2Ab) than those from non-Bt or single-toxin Bt cultivars (Cry1Ac), when mortality was assessed after 4 d (Table 1). After 2 and 4 d, survival of neonates fed leaves of dual-toxin Bt cultivars was less than those fed single-toxin Bt or non-Bt cultivars (Table 1). Higher survival rates were also found for larvae fed leaves of non-Bt cotton compared with single-toxin Bt cultivars. Although there was not a significant difference after 2 d, more larvae were alive after 4 d when fed pink flowers of a single-toxin Bt cultivar (NuCOTN 33B) compared with a dual-toxin Bt cultivar (MON15985).

A higher survival rate (Table 1) was observed for neonates fed 1-d-old bolls from non-Bt cotton (DPL50) compared with either Bt cultivar (NuCOTN 33B and MON15985). However, no significant differences were observed between the single and dual-toxin Bt cultivar.

Fresh Tissue Assays (Second Instar Bollworm, Beet Armyworm, and Fall Armyworm). Our results indicate that dual-toxin Bt cotton, compared with the non-Bt and the single-toxin cultivars, reduced the survival of second-instar larvae. Across all species and assays, cultivar effects on survival were highly significant (χ^2 = 60.7, df = 2, $P < 0.01$). The fewest larvae (36%) survived to the pupal stage when fed MON15985 than when fed plant material from DPL50B (64%) or DPL50 (77%). DPL50B had less of an impact on survival than MON15985 (χ^2 = 26.7, df = 1, $P < 0.01$). The greater effect of the dual-toxin cultivar on survival was especially apparent for beet armyworms (Table 2). Only 39% of the beet armyworms fed tissue from the MON15985 cultivar survived to pupation, but 93% of larvae survived when fed tissue from DPL50B. At 3, 7, and 15 d, the survival of both bollworm and fall armyworm was statistically less when fed MON15985 than when fed DPL50B. However, it should be noted that fall armyworm survival or

Table 2. Relative feeding, survival, mean larval lengths (mm ± SE), and delays in pupation when second-instar bollworm, fall armyworm, and beet armyworm were fed plant parts from cotton containing zero (DPL50), one (DPL50B, Cry1Ac), or two Bt proteins (MON15985, Cry1Ac and Cry2Ab)

Species	Plant part	Cultivar	n	Relative feeding[a]	Proportion of larvae surviving				Larval length (mm) after:		Pupation delay (d)[b]
					3 d	7 d	15 d	To pupa	5 d	7 d	
Bollworm	Flowers[c]	DPL50	59	1.72 ± 0.17a	0.65a	0.82a	0.67a	0.65a	15.6 ± 0.5a[m]	24.1 ± 0.6a[m]	0.00 ± 5.95a
		DPL50B	58	0.47 ± 0.07b	0.26b	0.19b	0.16b	0.07b	6.3 ± 1.0b[m]	16.5 ± 1.7b[m]	8.60 ± 1.19b
		MON15985	58	0.40 ± 0.07b	0.10c	0.07c[m]	0.02c[m]	0.00b	7.0 ± 1.3b	17.8 ± 1.9b	—
Fall armyworm	Flowers[c]	DPL50	60	2.25 ± 0.08a	1.00a	0.90ab[j]	0.86bc	0.75b	19.3 ± 0.5a[l]	21.0 ± 0.7a[l]	0.00 ± 0.30a[l]
		DPL50B	60	1.82 ± 0.07b	1.00a	0.95a	0.95a	0.90a	18.8 ± 0.5a[m]	19.8 ± 0.7a	−0.67 ± 0.94a
		MON15985	60	1.35 ± 0.07c	0.90b	0.86b	0.83c	0.69b	14.2 ± 0.4b[m]	17.0 ± 0.8b	2.16 ± 0.55b[m]
Beet armyworm	Leaves[d]	DPL50	57	1.25 ± 0.07a	1.00a	1.00a	0.89a	0.88a[l]	19.1 ± 0.4a[m,l]	21.1 ± 0.4a[l]	0.00 ± 0.16a[l]
		DPL50B	57	1.02 ± 0.05b	0.98a	0.96a	0.93a	0.93a	17.7 ± 0.7b[m]	19.7 ± 0.7a	0.46 ± 0.21a[m]
		MON15985	58	0.82 ± 0.05c	0.86b	0.81b	0.65b	0.39b[m]	11.1 ± 0.6c[m]	14.4 ± 0.9b[m]	1.29 ± 0.51b[m]

Numbers within columns and species not followed by a common letter are significantly different ($P < 0.05$; PROC Genmod [protected lsmeans] or PROC GLM, [Student–Newman–Keuls]; SAS Institute 1998). *n*, Number of insects tested, including approximately one half which were transferred to artificial diet after 48 h. Non-italicized superscripted letters indicate significant effects of assay method for indicated cultivar (m) or an interaction (i) between cultivars and assay methods.

[a] Relative feeding (0–5 scale, ±SE) 48 h after plant parts were infested.

[b] Pupation delay = delay in days relative to DPL50. No bollworm larvae survived to the pupal stage on MON15985.

[c] Entire white flowers, including bracts and all floral parts.

[d] Fully expanded leaves 4–6 nodes below the uppermost node.

MON15985 was only different from DPL50 on day 5. In all assays, the amount of feeding on the non-Bt cultivar (DPL50) was higher than on Bt cultivars. Both fall armyworms and beet armyworms fed less on tissue from MON15985 than on tissue from DPL50B.

The dual-toxin cultivar also had greater sublethal effects than did the single-toxin cultivar (Table 2). After 5 and 7 d, there was a reduction in the size of beet and fall armyworm larvae that were fed MON15985 versus DPL50 and DPL50B, and a corresponding delay in pupation was observed. Bollworm size was reduced by feeding on either of the Bt cultivars. No bollworms survived when fed MON15985, so the effect of this variety on time to pupation could not be determined. However, DPL50B caused a significant delay in bollworm pupation (8.6 d) relative to DPL50.

Generally, cultivar effects on survival and larval development were greater when larvae were fed plant materials continuously than when transferred to diet after 48 h. Across all comparisons, the assay method had a significant impact on survival to the pupal stage ($\chi^2 = 14.5$, df = 1, $P < 0.01$) and on other variables measured in our experiments. Fewer larvae survived to the pupal stage when continuously fed plant material (50%) than when transferred to diet (66%). Similarly, 5 d after originally infested on plant tissue, larvae that had been transferred to diet were larger (17.9 ± 0.3 mm) than those kept on tissue (14.6 ± 0.3 mm) ($F = 70.6$; df = 1, 378; $P < 0.01$).

Interactions between cultivar effects and assay method were detected for survival (e.g., survival to pupal stage across all comparisons: $\chi^2 = 7.8$, df = 2, $P = 0.03$) (Table 2). These interactions were related to the recovery of insects, after exposure to toxic plant tissue, when they were transferred to artificial diet. For plant tissue that was relatively nontoxic, transferring larvae to diet had little effect on survival. For example, beet armyworm survival to pupation was only 3% when insects were continuously fed plant material from MON15985. Survival in the MON15985 treatment was higher (75%) when beet armyworms were transferred to diet after 48 h ($\chi^2 = 16.0$, df = 1, $P < 0.01$), whereas the assay method did not affect beet armyworm survival for DPL50 and DPL50B cotton ($\chi^2 = 0.10$ and 0.01, df = 1, $P = 0.72$ and 0.91, respectively). Similar treatment interactions on larval length and pupation delay were detected for beet and fall armyworm. For example, fall armyworms continuously fed flowers of MON15985 and DPL50B were 13.0 ± 0.6 and 18.0 ± 0.6 mm long after 5 d, respectively. Larvae that had been transferred to diet after 48 h were larger (15.4 ± 0.6 and 19.9 ± 0.7 mm long on MON15985 and DPL50B, respectively). In contrast, 5-d larval lengths were similar for fall armyworms continuously fed DPL50 and for those transferred to diet (19.7 ± 0.7 and 18.8 ± 0.6 mm, respectively).

Fresh Tissue Assays (Third-Instar Bollworm). It appears that if bollworm larvae survive to the third instar by feeding on relatively nontoxic hosts or plant parts, they may then be able to survive and damage young bolls from dual-toxin Bt cultivars (Table 3). For any cultivar, no mortality was observed for larvae

on DPL50 on day 3.
ding on the non-Bt
on Bt cultivars. Both
rms fed less on tissue
from DPL50B.
ad greater sublethal
cultivar (Table 2).
ion in the size of beet
vere fed MON15985
corresponding delay
orm size was reduced
tivars. No bollworms
so the effect of this
d not be determined.
ificant delay in boll-
to DPL50.
survival and larval
larvae were fed plant
n transferred to diet
ns, the assay method
val to the pupal stage
d on other variables
ewer larvae survived
iously fed plant ma-
rred to diet (66%).
ested on plant tissue,
d to diet were larger
on tissue (14.6 ± 0.3
01).
ffects and assay
al (e.g., survival to
as: $\chi^2 = 7.8$, df = 2, P
tions were related to
sure to toxic plant
d to artificial diet.
y nontoxic, transfer-
fect on survival. For
val to pupation was
ntinuously fed plant
val in the MON15985
ten beet armyworms
h ($\chi^2 = 16.0$, df = 1,
ethod did not affect
L50 and DPL50B cot-
1, $P = 0.72$ and 0.91,
interactions on larval
detected for beet and
l armyworms contin-
35 and DPL50B were
ong after 5 d, respec-
nsferred to diet after
19.9 ± 0.7 mm long
ectively). In con-
ar for fall armyworms
r those transferred to
mm, respectively).
star Bollworm). It
survive to the third
ontoxic hosts or plant
survive and damage
ltivars (Table 3). For
observed for larvae

Table 3. Proportion of third instar bollworms that survived and penetrated 4-d-old bolls bulls when fed cotton containing ze (DPL50), one (NuCOTN 33B, Cry1Ac), or two Bt proteins (MON15985, Cry1Ac and Cry2Ab)

Cultivars	Surviving larvae, Boll penetration		
	2 d	4 d	6 d
DPL50	1.00a, 1.00a	1.00a, 1.00a	0.93a, 1.00a
NuCOTN 33B	1.00a, 0.82ab	0.74b, 0.86a	0.63b, 0.86a
MON15985	1.00a, 0.68b	0.72b, 0.80a	0.64ab, 0.80a
χ^2 (df = 2)[a]	0.00, 8.79	8.20, 5.17	6.26, 5.17
P	1.00, 0.01	0.02, 0.08	0.04, 0.08

Data were analyzed using PROC Freq (SAS Institute 1998). Numbers within columns not followed by a common lower letter are significant different (Fisher's exact test [two-tailed]; $P < 0.05$; Steel and Torrie 1980). n, Number of insects tested.
[a] Likelihood ratio chi-square (PROC Freq, SAS Institute 1998).

feeding on bolls for 2 d, and the ability to successfully penetrate the external boll wall was high (≥68.0%). While there was no difference in boll penetration between single and dual-toxin Bt cultivars, boll penetration was significantly reduced for the dual-toxin cultivar compared with the non-Bt cultivar. There were no significant differences in boll penetration between cultivars at 4 d, but larvae on both Bt cultivars had lower survival rates than the non-Bt cultivar. After 6 d, larval survival on Bt cultivars was similar and remained somewhat lower than survival on non-Bt cotton, but there was no difference in boll penetration among cultivars ($P > 0.05$).

Assays with Lyophilized Leaf Tissue (Neonate Bollworm and Tobacco Budworm). For all doses of plant material incorporated into the diet, average mortality of tobacco budworm and bollworm never exceeded 26% at 7 d. Thus, the doses used in this experiment were largely sublethal for this time frame. Across all cultivars and for both species, mortality only increased by ≈5% between 3 and 7 d (bollworm: $\chi^2 = 4.0$, df = 1, $P < 0.05$; budworm: $\chi^2 = 4.7$, df = 1, $P < 0.05$).

Despite the fact that the doses chosen were mostly sublethal, cultivar and dose significantly influenced the mortality of bollworm at 3 d ($\chi^2 = 34.1$, df = 2, $P < 0.01$ and $\chi^2 = 30.5$, df = 3, $P < 0.01$, respectively) and 7 d ($\chi^2 = 44.1$, df = 2, $P < 0.01$ and $\chi^2 = 26.4$, df = 3, $P < 0.01$, respectively). Bollworm mortality for MON15985 was about 9–13% higher than for the other cultivars on days 3 and 7. No significant difference in mortality was detected between DPL50 and DPL50B (Table 4). Lower dosages (1.124 and 11.24 μg/ml diet) tended to cause less mortality of bollworms at both three and 7 d. An interaction between cultivar and dose was detected 3 d after bollworm larvae were infested on treated diet ($\chi^2 = 16.8$, df = 6, $P = 0.02$), but not at 7 d ($\chi^2 = 11.7$, df = 6, $P > 0.07$). At 3 d, survival of bollworms fed 1.124, 11.24, 112.4, and 1124 μg of DPL50 plant tissue/ml of diet was 93.1, 91.4, 83.8, and 80.8%, respectively. For DPL50B, survival at these same dosages was 93.6, 91.4, 81.7, and 85.3%, respectively. So higher dosages tended to cause more mortality for these varieties, even for the non-Bt cultivar. Bollworm survival on MON15985 was 84.5, 73.2, 75.9, and 80.6% as dosages were increased. Thus, a clear dose–response pattern was not evident for the MON15985 cultivar, with greater mortality actually occurring at intermediate dosages.

Tobacco budworm survival was not significantl influenced by cultivar on either day 3 or 7 ($\chi^2 = 5.$ df = 2, $P > 0.07$ and $\chi^2 = 2.81$, df = 2, $P > 0.2$ respectively), and no interactions were found be tween treatment and dose for either day ($\chi^2 = 6.$ df = 6, $P > 0.33$ and $\chi^2 =$ 7, df = 6, $P > 0.4$ respectively). Despite the l... of cultivar effects o survival, there was a signific... ose–response on da 7 ($\chi^2 = 9.8$, df = 3, $P = 0.03$). ...8% more mortalit occurring at the highest dos... ured with the low est dose (Table 4).

Sublethal effects on la... development (i.e length) were greatly influen... cultivar and dos for both species. Cultivar ef... on bollworm (F = 197; df = 2, 563; $P < 0.01$) and ...worm ($F = 100$; df = 2, 563; $P < 0.01$) were simil... in that larvae fe MON15985 were typically smaller than larvae fe DPL50B, and larvae fed non-Bt cotton were large than those fed either of the Bt cultivars (Table 5). Th dose–response for bollworm and budworm also wer similar (bollworm: $F = 62.6$; df = 3, 563; $P < 0.01$, an budworm: $F = 76.0$; df = 3, 563, $P < 0.01$) in that larva fed higher doses were generally smaller than those fe lower doses. However, there was an obvious interac tion between cultivar and dose for both species (boll worm: $F = 6.81$; df = 6, 563; $P < 0.01$, and budworm

Table 4. Proportion of neonate bollworm and tobacco bud worm that survived after being fed lyophilized leaf tissue from cotton containing zero (DPL50), one (DPL50B, Cry1Ac), or tw Bt proteins (MON15985, Cry1Ac and Cry2Ab)

Analysis variable	Bollworm surviva...		Budworm surviva	
	3 d[a]		3 d	7 d
Cultivar DPL50	0.87a	...a	0.82a	0.78a
DPL50B	0.88a	...a	0.78a	0.75a
MON15985	0.79b	0.72b	0.82a	0.72a
Dose[b]				
1.124	0.90a	0.85a	0.83a	0.81a
11.24	0.85b	0.81ab	0.80a	0.78al
112.4	0.80c	0.75c	0.81a	0.78al
1124	0.82bc	0.76c	0.79a	0.73b

Leaf tissue was incorporated into diet at four different doses.
Means without columns not followed by a common letter ar significantly different ($P < 0.05$, PROC Genmod, protected lsmeans SAS Institute 1998).
[a] Indicates a significant interaction, for bollworm, between cultiva and dose on day 3 (see text).
[b] μg of plant tissue per ml of artificial diet.

Table 5. Mean length (mm ± SE) of bollworm and tobacco budworm larvae after 7 d when neonates were put on diet containing lyophilized leaf tissue at four different doses

Dose[a]	Bollworm length			Budworm length		
	DPL50	DPL50B	MON15985	DPL50	DPL50B	MON15985
1.124	15.7 ± 0.3Aa	14.9 ± 0.3Ba	11.0 ± 0.7Ca	13.2 ± 0.3Aa	13.0 ± 0.4Aa	13.6 ± 0.6Aa
11.24	15.6 ± 0.4Aa	13.6 ± 0.3Bb	11.2 ± 0.6Ca	13.5 ± 0.4Aa	13.0 ± 0.4ABa	12.4 ± 0.5Ba
112.4	14.3 ± 0.4Ab	13.1 ± 0.5Bb	8.1 ± 0.5Cb	13.3 ± 0.4Aa	12.4 ± 0.3Ba	8.7 ± 0.4Cb
1124	13.9 ± 0.5Ab	9.5 ± 0.3Bc	5.1 ± 0.3Cc	13.2 ± 0.4Aa	10.2 ± 0.3Bb	4.4 ± 0.3Cc

Leaves were from cotton containing zero (DPL50), one (DPL50B, Cry1Ac), or two Bt proteins (MON15985, Cry1Ac and Cry2Ab).
Means within a row and species not followed by a common uppercase letter are significantly different, and means within columns not followed by a common lower letter are significantly different ($P < 0.05$, PROC GLM, Student–Newman–Keuls, SAS Institute 1998).
[a] μg of plant tissue per ml of artificial diet.

$F = 34.5$; df = 6, 563; $P < 0.01$). Compared with DPL50B and MON15985, increasing the amount of DPL50 tissue incorporated into diet had a relatively small impact on larval growth. The dose–response for MON15985 was particularly evident for both species compared with the other varieties.

Discussion

It is uncertain how much additional protection from insects the insertion of this second Bt toxin-producing gene will give to cotton until it is introduced and used on a large scale. However, our data suggest that dual-toxin Bt cottons will provide substantially better control of lepidopteran pests compared with the existing, single-toxin Bt cultivars. In field studies, Stewart et al. (2000; unpublished data) have shown that the dual-toxin Bt cultivar (MON15985) provided a significant improvement in control of bollworm, soybean looper, and fall armyworm populations relative to the single-toxin cultivar (DPL50B). The superiority of cultivars expressing both Cry1Ac and Cry2Ab should be most apparent for soybean loopers, beet armyworms, and fall armyworms because these species are less affected than bollworm by the Cry1Ac single-toxin Bt cultivars that are presently available. The available, single-toxin Bt cottons sometimes require applications of foliar insecticides to control soybean looper, beet armyworm, fall armyworm, and bollworm. Based on these results and that of Stewart et al. (2000; unpublished data), the dual-toxin cultivars (expressing Cry1Ac and Cry2Ab) may not require supplemental insecticide applications for these pests.

Relative to the single-toxin Bt cultivar, the dual-toxin cultivar had similar and negative impacts on growth of both bollworm and tobacco budworm (Tables 4 and 5). This will have clear implications in managing resistance to Bt cotton for these pests (see Gabashnik 1994, Sachs et al. 1996, Gould 1998). Interestingly, a relatively small but significant dose–response was observed for bollworm when fed tissue from non-Bt cotton. Naturally occurring toxins in cotton leaves, such as gossypol, may have caused this effect (Lukefahr et al. 1975).

The interactions we detected between cultivar effects and assay method, for fresh tissue assays (Table 2), could indicate that one of the assay methods was not as reliable in separating treatment effects. These interactions resulted from the recovery of larvae after they were transferred from Bt-cotton tissue to diet (particularly MON15985), whereas recovery did not occur when insects were continuously fed plant material. Despite the interactions, similar conclusions concerning cultivar effects on larval survival and development would generally be made based on the results of either assay method. However, cultivar effects were more dramatic when larvae were kept on plant tissue throughout development. Thus, maintaining insects on plant material, rather than transferring to diet, appears the best approach for increasing the sensitivity of fresh-tissue assays.

Because we did not test a cultivar expressing Cry2Ab alone, we cannot conclude that Cry2Ab had greater activity on armyworms than the Cry1Ac toxin in DPL50B. Also, the amount of Bt toxins, Cry1Ac and Cry2Ab, expressed in the plant tissue was not determined. Greenplate et al. (2000) reported similar levels of Cry1Ac in near-isogenic lines of cotton expressing either Cry1Ac alone or Cry1Ac and Cry2Ab (referred to as "CryX" in his article). However, the level of Cry2Ab expression in plant tissue was ≈10 times that of Cry1Ac. The potency of Cry1Ac versus Cry2Ab, at equivalent doses, varies for different lepidopteran species (Sims 1997). Furthermore, the dose received by an insect was self-regulated in our assays. Nonpreference for the various toxic plant tissues may influence the dose ingested by individuals. Insects fed higher doses of Bt toxins may actually feed less as a result of gut paralysis (Sikorowski and Lawrence 1997), and thus, actually consume a smaller dose of plant tissue. Reduced feeding on Bt tissue was obvious in assays using fresh plant parts. So for our assays, these factors make it difficult to compare the sensitivity of different species to the various Bt toxins (or compare among 'doses' within a given assay) because the ingested dose was not known. However, assays with fresh tissue or lyophilized tissue were well suited for comparing the relative toxicity of plant tissues.

Reductions in larval length and pupation delays observed in fresh-tissue and lyophilized-tissue assays were most diagnostic of increased toxicity in the dual-toxin cultivars. Besides indicating the direct effects of the Bt toxins, these sublethal variables may also reflect the indirect impact of reduced feeding on toxic plant tissue. Assays using lyophilized plant tissue incorporated into diet have some advantages because plant

ength	
3	MON15985
Aa	13.6 ± 0.6Aa
ABa	12.4 ± 0.5Ba
3a	8.7 ± 0.4Cb
3b	4.4 ± 0.3Cc

Cry1Ac and Cry2Ab).
within columns not followed
te 1998).

304

overy of larvae after
otton tissue to diet
as recovery did not
iously fed plant ma-
similar conclusions
val survival and de-
made based on the
owever, cultivar ef-
larvae were kept on
ent. Thus, maintain-
ier than transferring
h for increasing the

cultivar expressing
d that Cry2Ab had
e Cry1Ac toxin
oxins, Cry1Ac and
issue was not deter-
ported similar levels
f cotton expressing
Cry2Ab (referred
vever, the level of
was ≈10 times that
Ac versus Cry2Ab, at
nt lepidopteran spe-
he dose received by
r assays. Nonprefer-
issues may influence
. Insects fed higher
ed less as a result of
awrence 1997), and
dose of plant tissue.
as obvious in assays
assays, these factors
ensitivity of different
(or compare among
ise the ingested dose
with fresh tissue or
or comparing the

nd pupation delays
hilized-tissue assays
oxicity in the dual-
e direct effects of
bles may also reflect
eding on toxic plant
plant tissue incorpo-
ntages because plant

tissues could be stored until needed. This allows for comparison among plant tissues collected at different times (e.g., early versus late season). Also, there is no need to periodically give fresh plant material to the insects. An additional advantage is that dosages can be adjusted so that excessive mortality caused by toxic plant tissue does not occur, and hence neonates can be used in assays. With fresh plant tissue, particularly with neonates, excessive mortality may make separating treatment effects (i.e., Bt cultivars) statistically difficult.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the review of the manuscript by Blake Layton, Mike Caprio, and Don Parker. Thanks are also given to Don Nordlund for providing insects used in some laboratory assays. This is journal article J9736 of the Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station.

References Cited

Adamczyk, J. J., Jr., J. W. Holloway, G. E. Church, B. R. Leonard, and J. B. Graves. 1998. Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ-endotoxin. J. Econ. Entomol. 91: 539–545.

Adamczyk, J. J., Jr., L. C. Adams, and D. D. Hardee. 2000. Quantification of CryIA(c) δ-endotoxin in transgenic Bt cotton: correlating insect survival to different protein levels among plant parts and varieties, pp. 929–932. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Ashfaq, M., and S. Y. Young. 1999. Effect of transgenic Bt-cotton on larval mortality and development of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), p. 1232–1234. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Caprio, M. A. 1994. Bacillus thuringiensis gene deployment and resistance management in single- and multi-tactic environments. Biocontrol Sci. Technol. 4: 487–497.

Chang, Yu-min, D. S. Luthe, F. M. Davis, and W. P. Williams. 2000. Influence of whorl region from resistant and susceptible corn genotypes on fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) growth and development. J. Econ. Entomol. 93: 477–483.

Davis, F. M. 1989. Rearing the southwestern corn borer and fall armyworm at Mississippi State, pp. 27–36. *In* Toward Insect Resistant Maize for the Third World: Proceedings of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects. CIMMYT, Mexico, D.F.

Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Annu. Rev. Entomol. 43: 701–726.

Greenplate, J. T., S. R. Penn, Z. Shappley, M. Oppenhuizen, J. Mann, B. Reich, and J. Osborn. 2000. Bollgard II efficacy: quantification of total lepidopteran activity in a 2-gene product, pp. 1041–1043. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conference. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Harris, F. A., F. T. Cooke, Jr., G. L. Andrews, and R. E. Fur Jr. 1997. Monitoring node above white flower as a bas for cotton insecticide treatment termination. Bulleti 1068. Mississippi Agricultural Forest Experiment Statio Mississippi State, MS.

King, E. G., and G. G. Hartley. 1985. Heliothis virescens, p 323–328. *In* P. Singh and R. Moore [eds.], The handboo of insect rearing. Elsevier, Amsterdam.

Lambert, A. L., J. R. Bradley, Jr., and J. VanDuyn. 199 Effects of natural enemy conservation and planting dat on the susceptibility of Bt cotton to *Helicoverpa zea* i North Carolina, pp. 931–932. *In* P. Dugger and D. Richte [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conference. Na tional Cotton Council of America, Memphis, TN.

Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D Wolfinger. 1996. SAS[7] system for mixed models. SA Institute, Cary, NC.

Lukefahr, M. J., J. E. Houghtaling, and D. G. Cruhm. 197 Suppression of *Heliothis* spp. with cotton containing com binations of resistant characters. J. Econ. Entomol. 6 743–746.

Luttrell, R. G., A. Abbas, S. Y. Young, and K. Knighten. 199 Relative activity of commercial formulations of *Bacillu thuringiensis* against selected noctuid larvae (Lepidop tera: Noctuidae). J. Entomol. Sci. 33: 365–377.

Luttrell, R. G., L. Wan, and K. Knighten. 1999. Variation i susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attackin cotton and soybean to purified endotoxin proteins an commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ Entomol. 92: 21–32.

Mahaffey, J. S., J. R. Bradley, Jr., and J. W. VanDuyn. 1995 Bt cotton: field performance in North Carolina unde conditions of unusually high bollworm populations, pp 795–797. *In* D. Richter and J. Armour [eds.], Proceeding Beltwide Cotton Conference. National Cotton Council o America, Memphis, TN.

Sachs, E. S., J. H. Benedict, J. F. Taylor, D. M. Stelly, S. K Davis, and D. W. Altman. 1996. Pyramiding CryIA(b) insecticidal protein and terpenoids in cotton to resis tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). Environ Entomol. 25: 1257–1266.

SAS Institute. 1998. SAS/STAT user's guide: release 7.00 SAS Institute, Cary, NC.

Sikorowski, P. P., and A. M. Lawrence. 1997. Major disease of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in Mississipp fields and insectaries. Technical Bulletin 218 Mississipp Agricultural Forest Experiment Station, Mississippi State MS.

Sims, S. R. 1997. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. Southwest Entomol. 22: 395–404.

Steel, R.G.D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of statistics, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.

Stewart, S. D., J. T. Reed, R. G. Luttrell, and F. A. Harris 1998. Cotton insect control strategy project: comparing Bt and conventional cotton management and plant bug control strategies at five locations in Mississippi, 1995–1997, pp. 1199–1203. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.] Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Stewart, S. D., K. S. Knighten, and F. M. Davis. 2000. Efficacy of Bt cotton expressing two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on selected lepidopteran pests, pp. 1043–1048. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.] Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39: 47–79.

Turnipseed, S. G., and M. J. Sullivan. 1999. Consequences of natural enemy disruption with applications of "hard" insecticides prior to the bollworm flight in conventional and B.t. cotton, pp. 1110–1112. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Williams, M. R. 2000. Cotton insect loss estimates–1999, pp. 884–913. *In* P. Dugger and D. Richter [eds.], Proceedings Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Received for publication 28 July 2000; accepted 3 February 2001.

D3 293 296

PERFORMANCE OF BOLLGARD II COTTON AGAINST LEPIDOPTEROUS PESTS IN THE LOWER RIO GRANDE VALLEY OF TEXAS

John W. Norman, Jr. and Alton N. Sparks, Jr.
Texas Agricultural Research and Extension Center
Weslaco, TX

Abstract

The Bollgard II variety, which has not been licensed for use by commercial agriculture as of this report date was tested against several lepidopterous pest species. Results indicated that as the cotton leaf aged, increased larval mortality was recorded. The results show promise for improved control of the various tested species with Bollgard II compared to a currently registered Bollgard variety, DPL 50 B and a non-Bollgard variety, DPL 50.

Introduction

The introduction of genetically altered cotton varieties throughout the U.S. cotton belt in 1995 has resulted in some significant changes in insect management. Growers have had to change their decision making process about insect management since the now-insect resistant varieties provide some, but not 100 percent, control of various pests. As new versions of the genetically altered varieties come into the market, growers need current research data to assist them in making variety choices. The objective of this study was to evaluate the relative efficacy of Bollgard II against lepidopterous pests compared to it parental Bollgard line.

Methods and Materials

A small plot trial was planted at the Texas A&M Research and Extension Center Hiller Farm to evaluate the efficacy of Bollgard II against lepidopterous caterpillars. In conjunction with this field trial, a series of laboratory bioassays were conducted to evaluate the efficacy of Bollgard II against the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) (BAW) and the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*), also known as the corn earworm (CEW). These bioassays also included evaluation of the effects of leaf age on efficacy.

The field portion of this test consisted of a randomized complete block design with four replications of six treatments. The treatments were three cotton varieties, with two plots of each variety; one designated for treatment with an insecticide as needed and the other designated for non-treatment evaluated included DPL 50, DPL 50B (Bollgard), and DPL 15985 (Bollgard II). Plot size was 8 rows (40 inch centers) by 30 feet. The data presented in this study was collected from non-treated plots only.

The laboratory bioassays were conducted with larvae (CEW and BAW) provided by the USDA-ARS laboratory in Weslaco, Texas. For each bioassay, leaves were collected from each plot and transported to the laboratory. Leaf disks (7/8 inch diameter) were cut with a cork borer and placed in a 3/4 ounce diet cup which contained a 7/8 inch disk of filter paper moistened with RO water. A single larva was placed on each leaf disk, with ten larvae per treatment per replication. Mortality was checked every two days for 10 days, and leaf disks were replaced with freshly cut disks every two days. At 10 days after initial exposure, any surviving larvae were counted and weighed.

Bioassays were initiated on three dates: On May 22, bioassays were conducted against BAW and CEW using the third leaf from the terminal of each plant. Plants at this time consisted of approximately 12 nodes. These bioassays were initiated with neonate larvae of both species

On May 23, a single bioassay was conducted against BAW. This bioassay was initiated with 1 day old larvae. This bioassay included evaluation of the third and sixth leaf from the terminal. Plants at this point contained approximately 12 nodes.

On June 5, both species of caterpillar were bioassayed against the third, sixth, and ninth leaf of each variety. Neonate larvae were used to initiate the bioassays. Plants contained 14 to 15 nodes at this point in the season.

Field populations of lepidopteran larvae remained low until fairly late in the season. Insecticidal treatments were applied to the wrong plots shortly after larvae first appeared, resulting in a single date of field larval counts for this study. On July 3, drop cloth samples were taken in the field plots to determine the number of lepidopterous larvae present in 6 feet of row. Larvae were identified and counted by species.

Seed cotton was harvested for fiber quality analysis and ginned in a 10 saw portable gin. Fiber quality was determined by collecting seed cotton, ginning same and sending it to the International Textile Center in Lubbock, Texas for analysis.

All data were analyzed with the PROC GLM procedure of PC-SAS. Where significant differences were indicated ($P<0.05$), means were separated with DMRT ($P=0.05$).

Results and Discussion

Bollgard provided increased mortality and decreased larval weights in surviving larvae of CEW as compared to DPL 50 (Tables 1, 3 and 5), but generally showed minor impact on BAW (Table 2, 3, and 6.). Bollgard II generally showed increased activity on both species as compared to Bollgard, with increased mortality and greatly decreased survivor weights (Tables 1 - 6). All three bioassays on leaf age generally showed decreased survival on older leaves (Tables 4 - 6).

Bioassays were also conducted with square bracts (data not presented). These bioassays showed near 100% mortality of CEW on all three varieties, while BAW data closely resembled the leaf bioassay data.

Bollworm, beet armyworm, cabbage looper (*Trichoplusia ni*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (*FAW*) appeared in the test field very late in the season. Larval feeding was primarily confined to leaves due to severe loss of fruit from prior boll weevil damage. Field counts of larvae in this test indicated that Bollgard II was superior in protection from the various species encountered since all counts in the Bollgard II were zero and statistically different from Bollgard and DPL 50 (Table 7). Previous research conducted by the authors (unpublished data) indicated that tobacco budworm were significantly reduced by Bollgard II compared to the standard non-Bollgard variety DPL 50 and equal to DPL 50B.

Yield data were not taken because boll weevil damage was so severe as to make harvest non economic. No significant differences in fiber quality were detected among the varieties (Table 8).

Table 1. Bollgard test mortality of neonate CEW larvae reared on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third leaf from the terminal of plants with 12 nodes. Initiated May 22, 2000.

	Percent mortality at specified days after exposure				
Variety	2 DAE	4 DAE	6 DAE	8 DAE	10 DAE
BG,II	21.7 a	73.3 a	75.0 a	80.0 a	81.7 a
DPL	5.0 b	16.7 b	18.3 b	18.3 b	20.0 b
DPL 50	1.7 b	1.7 b	1.7 b	1.7 c	1.7 c

Numbers within a column followed by the same letter are not significantly different (DMRT).

Reprinted from the *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*
Volume 2:833-835 (2001)
National Cotton Council, Memphis TN

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Table 2. Bollgard test mortality of neonate BAW larvae reared on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third leaf from the terminal of plants with 12 nodes. Initiated May 22, 2000.

	Percent mortality at specified days after exposure				
Variety	2 DAE	4 DAE	6 DAE	8 DAE	10 DAE
BG II	11.7 a	46.7 a	60.0 a	68.3 a	73.3 a
DPL 50B	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	8.3 b
DPL 50	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b

Numbers within a column followed by the same letter are not significantly different (DMRT).

Table 3. Bollgard test surviving larvae weights of neonate CEW and BAW larvae reared for 10 days on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third leaf from the terminal of plants with 12 nodes. Initiated May 22, 2000.

	Mean Larval Weights	
Variety	CEW	BAW
BG II	0.003 c	0.001 c
DPL 50B	0.008 b	0.016 a
DPL 50	0.054 a	0.027 a

Numbers within a column followed by the same letter are not significantly different (DMRT).

Table 4. Bollgard test mortality of one day old BAW larvae reared on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third and sixth leaf from the terminal of plants with 12 nodes. Initiated May 23, 2000.

	Percent mortality at specified days after exposure			
	2 DAE		4 DAE	
Variety	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 3	Leaf 6
BG II	45.0 a	97.5 a*	72.5 a	100.0 a
DPL 50B	5.0 b	37.5 b*	7.5 b	45.0 b*
DPL 50	2.5 b	15.0 b	7.5 b	27.5 b
	6 DAE		8 DAE	
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 3	Leaf 6
BG II	85.0 a	100.0 a	92.5 a	100.0 a
DPL 50B	7.5 b	47.5 b*	7.5 b	47.5 b*
DPL 50	7.5 b	27.5 b	7.5 b	27.5 b
	10 DAE		Mean Larval Weight (g)	
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 3	Leaf 6
BG II	95.0 a	100.0 a	----	----
DPL 50B	10.0 b	47.5 b*	0.008 b	0.007 b
DPL 50	7.5 b	27.5 b	0.010 a	0.010 a

Numbers within a column followed by the same letter are not significantly different (DMRT).
* following a value indicates that the mortalities on the 3rd versus 6th leaf were significantly different for the indicated DAE and variety.

Table 5. Bollgard test mortality and surviving larvae weights and sizes of neonate CEW larvae reared for 10 days on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third, sixth and ninth leaf from the terminal of plants with 14 to 15 nodes. Initiated June 5, 2000.

	Percent mortality at specified days after exposure		
Variety	2 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	17.5 Aa	17.5 Aa	10.0 Aa
DPL 50B	7.5 Aa	12.5 Aa	20.0 Aa
DPL 50	5.0 Aa	0.0 Aa	2.5 Aa
	4 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	72.5 Ab	87.5 Aa	97.5 Aa
DPL 50B	30.0 Ba	25.0 Ba	42.5 Ba
DPL 50	7.5 Ba	2.5 Ca	2.5 Ca
	6 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	80.0 Ab	97.5 Aa	100.0 Aa
DPL 50B	52.5 Bc	52.5 Ba	57.5 Ba
DPL 50	20.0 Ca	5.0 Ca	10.0 Ca
	8 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	90.0 Aa	100.0 Aa	100.0 Aa
DPL 50B	67.5 Ba	82.5 Ba	90.0 Aa
DPL 50	45.0 Ca	27.5 Ca	22.5 Ba
	10 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	100.0 Aa	90.0 Aa	100.0 Aa
DPL 50B	87.5 Aa	97.5 Aa	95.0 Aa
DPL 50	52.5 Ba	50.0 Ba	37.5 Ba
	Mean larval weights (g) at 10 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	----	----	----
DPL 50B	0.001 B	0.001	0.003
DPL 50	0.010 Aa	0.009 a	0.007 a

Numbers within a data category and leaf age (column) followed by the same UPPER CASE letter are not significantly different (DMRT).
Numbers within a data category and variety (row) followed by the same LOWER CASE letter are not significantly different (DMRT).

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Table 6. Bollgard test mortality and surviving larvae weights and sizes of neonate BAW larvae reared for 10 days on leaf disks of selected cotton varieties. Leaf disks were cut from the third, sixth and ninth leaf from the terminal of plants with 14 to 15 nodes. Initiated June 5, 2000.

	Percent mortality at specified days after exposure		
	2 DAE		
Variety	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	35.0 Aa	42.5 Aa	82.5 Aa
DPL 50B	0.0 Ba	0.0 Ba	0.0 Ba
DPL 50	0.0 Ba	0.0 Ba	0.0 Ba
	4 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	40.0 Ac	67.5 Ab	95.0 Aa
DPL 50B	0.0 Ba	0.0 Ba	2.5 Ba
DPL 50	2.5 Ba	5.0 Ba	0.0 Ba
	6 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	67.5 Ac	72.5 Ab	100.0 Aa
DPL 50B	0.0 Ba	0.0 Ba	2.5 Ba
DPL 50	2.5 Ba	5.0 Ba	2.5 Ba
	8 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	57.5 Ab	72.5 Ab	100.0 Aa
DPL 50B	0.0 Ba	2.5 Ba	2.5 Ba
DPL 50	2.5 Ba	5.0 Ba	7.5 Ba
	10 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	60.0 Ab	75.0 Ab	100.0 Aa
DPL 50B	0.0 Ba	2.5 Ba	7.5 Ba
DPL 50	2.5 Ba	7.5 Ba	7.5 Ba
	Mean Larval Weights (g) at 10 DAE		
	Leaf 3	Leaf 6	Leaf 9
BG II	0.001 Ca	0.001 Ca	----
DPL 50B	0.012 Bb	0.017 Ba	0.008 Ac
DPL 50	0.014 Ab	0.020 Aa	0.008 Ac

Numbers within a data category and leaf age (column) followed by the same UPPER CASE letter are not significantly different (DMRT).
Numbers within a data category and variety (row) followed by the same LOWER CASE letter are not significantly different (DMRT).

Table 7. Lepidopterous larval counts in Bollgard test cotton varieties, TAMU "Hiler" farm annex, Weslaco, Texas, July 3, 2000.

	Number of Larvae/6 feet row				
Variety	Loopers	BAW	CEW	FAW	Total Leps
DPL 50	54.6 a	2.3 a	3.3 a	4.3 a	64.5 a
DP 50B	63.3 a	1.6 a	4.4 a	4.4 a	73.6 a
DP BG II	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b

Table 8. Bollgard test cotton variety fiber quality results. TAMU "Hiler" annex farm, Weslaco, Texas 2000.

Variety	Micronaire	Staple	Strength
BGII	3.7	1.20	31.0
DPL 50	3.5	1.18	31.5
DPL 50B	3.5	1.22	33.4
BGII	3.9	1.22	30.6
DPL 50	3.5	1.17	31.3
DPL 50 B	3.4	1.20	32.8

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

D2

296
309

FIELD EFFICACY OF COTTON EXPRESSING TWO INSECTICIDAL PROTEINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

J. S. Akin, N. P. Stewart and K. S. Knighten
Department of Entomology and Plant Pathology
Mississippi State University
Mississippi State, MS

Abstract

Field studies were conducted in 1999 and 2000 to evaluate field efficacy of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) expressing two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) on various lepidopteran pests. Near-isogenic varieties including non-transgenic, single-toxin, and dual-toxin cotton were compared for heliothine numbers, numbers of occasional lepidopteran pests, damaged terminals, boils, and squares, and seed cotton yield. Relative to the non-Bt cotton cultivar, both single and dual-toxin cotton caused a significant reduction in the numbers of heliothine larvae, damaged terminals, and damaged squares and bolls found during visual sampling. Generally, fewer heliothines were found in MON15985 than in DPL50B or DPL50 (Table 1, Figure 1). Additionally, fewer heliothines were found in unsprayed subplots with cotton expressing both Cry1Ac and Cry2Ab than non-Bt subplots treated with insecticide. There was no significant difference in damaged terminals, squares, or bolls (predominantly due to bollworm) between single and dual-toxin varieties, but both Bt cultivars exhibited less damage than non-Bt cotton. Cotton expressing one and two insecticidal proteins reduced cumulative bollworm populations 79% and 96% for both years, respectively. Although single-toxin cotton only incited a 14% cumulative reduction of fall armyworms, populations were reduced by 96% in cotton expressing two Bt toxins compared with non-Bt cotton and cotton expressing Cry1Ac alone. Dual-toxin Bt cotton caused a 94% cumulative reduction in soybean loopers, when compared to non-Bt cotton. More soybean loopers were found in the single-toxin Bt cotton than the non-Bt cultivar. Although both single and dual toxin improved seed cotton yield over non-Bt cotton, there was no significant difference between the two varieties.

These data suggest that the insertion of the Cry2Ab gene will provide substantially better control of a wide range of lepidopteran pests when compared to cotton expressing Cry1Ac alone. Since armyworms and loopers are not as affected by the single-toxin cultivar as heliothines, the true benefit of this second toxin-producing gene will likely be more apparent for these occasional pests. However, control of bollworms should also be improved.

Introduction

For many years, lepidopteran pests have been a major source of economic damage in cotton throughout the United States. Much of the total economic damage induced by insects and control costs involved can be attributed to the tobacco budworm (*Heliothis virescens*), bollworm (*Helicoverpa zea*), fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), beet armyworm (*Spodoptera exigua*), and soybean looper (*Pseudoplusia includens*) (Williams 2000).

The use of insecticides has been an effective method of controlling caterpillar pests in cotton. The issues of insecticide resistance (Holland et al. 1990, Graves et al. 1994) and the negative impact on non-target, beneficial arthropod populations, however, has spawned an interest in alternate control methods for these pests. In 1996, transgenic cotton expressing the Cry1Ac δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* was introduced for commercial production (i. e., Bollgard™; Monsanto Company, St. Louis, MO). This technology provides season-long control of lepidopteran pests, particularly the heliothine complex. Although this new technology has proven to be quite effective, some weaknesses have been noted, such as lack of efficacy against occasional pests (e.g., armyworms, loopers) and high populations of bollworm.

Cotton expressing two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* (i.e., Bollgard II™) has recently been developed by Monsanto Company. This transgenic cotton not only expresses the Cry1Ac toxin, but an additional gene expressing Cry2Ab toxin has been added to aid in control of occasional pests and high populations of bollworm. The addition of this second toxin to the original Bt cotton variety can potentially provide additional control of occasional pests as well as bollworms present in high populations.

Materials and Methods

In 1999 and 2000, field studies were conducted to compare the relative efficacy of near-isogenic lines of cotton expressing none, one, or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on certain lepidopteran pests. Three varieties of cotton were planted: DPL50 (non-Bt), DPL50B (expresses Cry1Ac), and MON15985 (expresses Cry1Ac and Cry2ab). Four main plots of each cultivar were planted on 20 May, 1999 and 16 May, 2000 in a randomized complete block design at the Plant Science Research Center, Mississippi State, MS. Both years, cotton was planted at 11.7 seeds/m using a cone planter. Each plot was 12 rows wide (97 cm row spacing) and 15-m long and was divided into a four-row sprayed subplot and an eight-row unsprayed subplot. Sprayed subplots were treated with insecticide for control of lepidopteran pests based on average insect counts made in the non-Bt cultivar, such that whenever the DPL50 plots exceeded a treatment threshold for any lepidopteran pests, insecticide was applied to all varieties. After the initial insecticide application, only insect samples in sprayed subplots were used to trigger subsequent applications. Insecticide treatments contained 76 g ai/ha spinosad + 37 g ai/ha cyfluthrin. All insecticide applications were made with a high-clearance, small plot tractor calibrated to deliver a spray volume of 68 l/ha. Unsprayed subplots were not treated for lepidopteran pests with insecticide.

No at-planting insecticides were used either year, but 227 g ai/ha acephate was applied to all plots approximately one week after plant emergence. Additionally, several applications of ULV malathion (222g ai/ha) were made to all plots during the course of the season as part of the existing boll weevil eradication program. Applications for the control of caterpillar pests (primarily bollworm and tobacco budworm) were made to sprayed subplots on 29 July and 4, 13, and 27 August of 1999 (latter application for soybean loopers). In 2000, insecticide applications were made on 12 and 29 July and 5 August. Based on insect control recommendations for Mississippi cotton (Layton 1999, 2000) no other insecticide applications were necessary, either in 1999 or 2000. All plots were furrow irrigated four times in 1999 and five times in 2000.

In order to determine relative efficacy of the different cultivars under field conditions, naturally occurring populations were monitored twice weekly via visual, sweep-net, and drop-cloth samples. Prior to the initiation of insecticide applications for heliothines (29 July in 1999 and 12 July in 2000), samples were taken randomly throughout each main plot. Following the first application, samples were taken in the four sprayed rows and the four adjacent unsprayed rows. The remaining unsprayed rows were used as a source of plant material for use in laboratory assays.

Visual samples consisted of examining the top five nodes of fifteen plant terminals in sprayed and unsprayed subplots for heliothines. Also examined were fifteen half-grown or larger squares and fifteen half-grown or smaller bolls for damage and the presence of lepidopteran pests, particularly bollworms, tobacco budworms, or fall armyworms. On most sampling dates, fifteen sweeps with a 38-cm diameter sweep net were made

Reprinted from the *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*
Volume 2:1041-1043 (2001)
National Cotton Council, Memphis TN

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

in each subplot in 1999 and 2000. For drop cloth samples, one sample (1.8 m of row) was taken in each subplot in 1999 and two were taken in each subplot in 2000. For both years, numbers of soybean loopers and beet armyworms were recorded. Seed cotton yields were estimated by harvesting the center two rows of each subplot on 8 October in 1999 and 29 September in 2000.

Data were pooled for both years, and were analyzed using split-plot analysis of variance procedures and using linear contrasts for mean separation (α=0.05, Proc GLM Contrasts, SAS 1998).

Results

Relative to the non-Bt cotton cultivar, our data indicated that both single and dual-toxin cultivars caused a significant reduction in the numbers of heliothine larvae, damaged terminals, and damaged squares and bolls found during visual sampling. There was no interaction between cultivar and insecticide in either year. Generally, fewer heliothines were found in dual-toxin cotton than in single-toxin or non-Bt cotton (Table 1, Figure 1). Fewer heliothines were also found in unsprayed subplots of MON15985 compared to DPL50 subplots treated with insecticide (Table 1). For damaged terminals, squares, and bolls (predominantly caused by bollworm), less damage was noted in the single and dual-toxin varieties than in the non-Bt variety (Table 2).

For other lepidopteran pests, only soybean loopers were present in high numbers during August of 1999, and moderate levels of fall armyworm were found in 2000. Cumulative counts represent numbers of total insects in visual, sweep net and drop cloth samples in sprayed and unsprayed subplots for both years. Cumulative counts showed a 79% and 96% reduction of bollworm larvae in Bollgard II plots, compared to those with original Bollgard and non-Bt, respectively (Figure 1). In both years, only one bollworm >1/4 inch was found in MON15985 as opposed to >10 that were found in DPL50B. For fall armyworm, plots containing dual-toxin cotton reduced larvae by 96% over both non-Bt and single-toxin cotton in 1999 and 2000 (Figure 2). Populations of soybean looper were also significantly reduced in plots containing dual-toxin cotton (96%). There were 41% more soybean loopers in the single toxin variety than the non Bt cotton (Figure 3).

Seed cotton yield for both 1999 and 2000 showed an increase by at least 15% in single or dual-toxin cotton, compared to the non-Bt variety (Figure 4). However, unsprayed subplots out-yielded those treated with insecticide by 8% (Figure 5). This is due to unusually high yield in unsprayed subplots in 1999. There was no interaction between cultivar and insecticide in either year.

References

Pelland, C. M., H. N. Pitre, R. G. Luttrell, and J. L. Hafer. 1990. Evidence of resistance to pyrethroid insecticides in field populations of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi. J. Econ. Entomol. 83: 35-40.

Graves, J. B., B. R. Leonard, E. Burress, S. Micinski, S. H. Martin, C. A. White and J. L. Baldwin. 1994. Status of insecticide resistance in tobacco budworm and bollworm in Louisiana. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. 2:769-774. National Cotton Council, Memphis, TN.

Layton, M. B. 1999. Cotton Insect Control Guide--1999. Miss. Coop. Ext. Serv. Publ. 343. 35 pp.

Layton, M. B. 2000. Cotton Insect Control Guide--2000. Miss. Coop. Ext. Serv. Publ. 343. 35 pp.

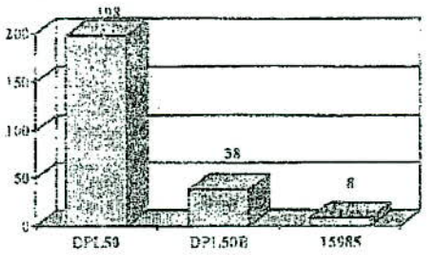
Williams, M. R. 2000. Cotton insect loss estimates -- 1999. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. 2:88--887. National Cotton Council, Memphis, TN.

Table 1. Percent heliothine infestation in non-Bt, single-toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.

		% Heliothine-infested terminals	% Heliothine-infested squares/bolls	% Heliothines in all samples
DPL50	unsprayed	2.39 a	2.22 a	2.19 a
	sprayed	1.16 b	0.74 b	0.68 b
DPL50B	unsprayed	0.39 bc	0.35 bc	0.35 bc
	sprayed	0.47 bc	0.28 bc	0.24 cd
15985	unsprayed	0.04 c	0.08 c	0.06 d
	sprayed	0.30 bc	0.19 bc	0.15 cd

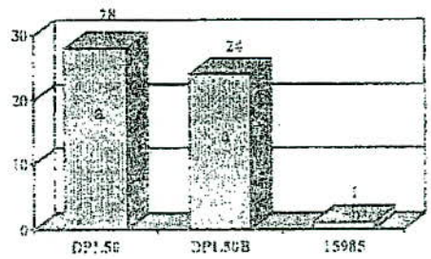
Table 2. Percent damaged terminals, squares, and bolls in non-Bt, single toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.

	% Damaged terminals	% Damaged squares	% damaged bolls
DPL50	9.44 a	0.92 a	0.83 a
DPL50B	1.76 b	0.18 b	0.13 b
15985	1.14 b	0.14 b	0.05 b



Means not followed by the same letter are significantly different (X^2, P<0.05)

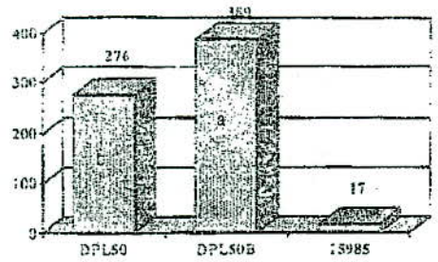
Figure 1. Cumulative counts for bollworm in non-Bt, single toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.



Means not followed by the same letter are significantly different (X^2, P<0.05)

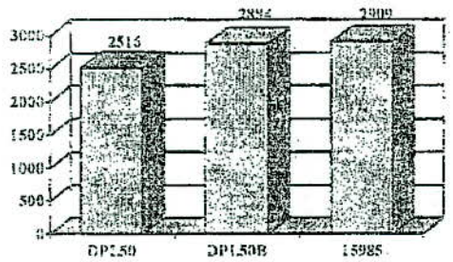
Figure 2. Cumulative counts for fall armyworm in non-Bt, single toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"



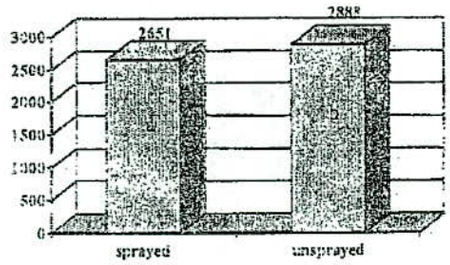
Means not followed by the same letter are significantly different (X^2, P<0.05)

Figure 3. Cumulative counts for soybean looper in non-Bt, single toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.



Means not followed by the same letter are significantly different (P<0.05, Proc GLM (LSmeans, pdiff), SAS Institute 1998)

Figure 4. Seed cotton yield from non-Bt, single toxin, and dual-toxin transgenic cotton varieties in 1999 and 2000.



Means not followed by the same letter are significantly different (P<0.05, Proc GLM (LSmeans, pdiff), SAS Institute 1998)

Figure 5. Seed cotton yield from sprayed and unsprayed subplots in 1999 and 2000.

Supplied by The British Library - "The world's knowledge"

Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 64/5b, 1999

D6.

DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD: A CASE STUDY

pp. 459-462 (4)

P. Windels*, I. Theuns*, J. Dendauw*, A. Depicker**, E. Van Bockstaele*,*** and M. De Loose*

* Department of Plant Genetics and Breeding, CLO, Caritasstraat 21, B-9090 Melle, Belgium
** Department of Molecular Genetics, University Gent, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium
*** Department of Plant Production, University Gent, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium

Summary

A strategy for a line specific GMO detection is presented. The method makes use of the anchored-PCR and can be used to screen foods for unauthorised GMOs. It is demonstrated that the proposed strategy is useful to develop a primer pair that can detect RoundUp Ready™ (Monsanto) soybean DNA in a line specific way.

Introduction

More and more foods are containing genetically modified organisms (GMOs) or GMO derived products. In the European Union such foods are regulated by regulation 90/220/EC and the directive Novel Food. These regulations stipulate a premarket approval and labelling requirements for foods derived from or containing GMOs. In this context, it is obvious that the authorities involved should have an adequate methodology for the identification of GMOs.

Up to now most DNA-based detection methods use the Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify parts of the inserted transgene. These PCR-based detection methods focus on frequently used genetic elements in GMOs, such as promoters, terminators, marker genes, etc. (Meyer, 1995; Pietsch *et al.*, 1997; Hupfer *et al.*, 1998). The disadvantage of such detection methods is that they are not line specific. This implies that it is impossible to discriminate between events that were obtained, using the same or similar transformation vectors.

Here we present a strategy to develop a line specific GMO detection procedure without preknowledge of the DNA sequence of the inserted fragment. The technique is based on the anchored-PCR (Theuns *et al.*, in preparation). This transgene display, used to amplify the junction between the insert and the plant-DNA, starts with digestion of the isolated DNA. By using a radioactively labelled anchor-primer, that is homologous with the border region of the inserted DNA, and an adapter-primer, that is specific for the adapter that is ligated at the end of each restriction fragment, the junction is specifically amplified. Subsequently the junctions are separated on a polyacrylamide gel after which the desired junction can be isolated from the gel. A method for the rapid isolation and subsequent sequencing of insert junctions is described. The obtained sequence data of the flanking plant-DNA of a particular T-DNA enabled us to design event-specific primers. Thereupon the newly designed event-specific primer together with the above mentioned anchor-primer is used in a regular PCR reaction to amplify an unique fragment spanning the junction between plant-DNA and the inserted DNA.

The technique is successfully being used to isolate and characterise the insert junction with plant-DNA of Monsanto's soybean line 40-3-2, a glyphosate tolerant soybean line, commercialised as RoundUp Ready (RR) soybeans. A line specific detection for RR soybeans is developed.

Materials and Methods

Anchored-PCR

The anchored-PCR was conducted as described by Theuns *et al.* (in preparation), using 5 different restriction enzymes – 1 hexacutter (EcoRI) and 4 tetracutters (MseI, MboI, BfaI and TaqI)

homologous to the 35S promoter region (35S-primer) and one homologous to the nos 3' terminato region (3' nos-1-primer).

Isolation of junctions

In order to isolate the correct junction from the dried polyacrylamide gel, we superimposed the autoradiogram upon the gel. In this way the autoradiogram could be used as a template to find the fragment of interest on the gel. The desired junction was excised out of the gel using a sharp scalpel. The junction-DNA was eluted out of the gelslice by incubating the slice in 200 µl of water during 1 hour on ice. During this incubation the solution was mixed 3 to 4 times. After a centrifugation of 10 min. at maximum speed, 150 µl of the eluate was collected and could be used for further processing.

Reamplification and sequencing of junctions

Before reamplification the eluate had to be purified. For this purification the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) was used.

The reamplification of each junction was done using the same primers as the primers that were used during anchored-PCR to generate the junction. The PCR was conducted using following conditions : 1µl of purified eluate, 1X PCR-buffer (Perkin Elmer, USA), 250 µM dNTP's (Pharmacia Biotech, USA), 0.4 µM anchor-primer and 0.4 µM adapter-primer. Water was added to a final volume of 50 µl. The PCR cycle profile used was the same as used during anchored-PCR. Cycle 1: 25s at 93°C, 30s at 65°C and 60s at 72°C; cycle 2-13: 25s at 93°C, 30s at an annealing temperature 0.7°C lower than for each previous cycle, starting at 64.3°C, 55s at 72°C; cycle 14-37: 25s at 93°C, 30s at 56°C and 55s at 72°C.

After completion of the PCR programme, the 50 µl reaction volume was loaded on a 1.5 % agarose gel. After electrophoresis the gel was stained with ethidium bromide and the reamplified fragments were visualised using an UV transilluminator. The reamplified fragments were excised from the agarose gel and the junctions were eluted from the gelslice using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). The concentration of the excised fragments was determined on a 1.5 % agarose gel, and the solution was concentrated to 25 ng/µl by means of ethanol precipitation.

Subsequently the junctions were sequenced using the ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) according to the handbook provided with the kit. The junctions were sequenced in both directions by using on the one hand the anchor-primer and on the other hand the adapter-primer as the sequencing primers. An ABI Prism 377 DNA Sequencer and matching software were used to separate the sequencing reactions and to analyse the sequence information.

Recent results obtained with other junction fragments, show that it is possible to reamplify the junctions without performing a pre-purification step on the eluate.

Line specific RR soybean PCR

The line specific amplification of the DNA was carried out in a total volume of 25 µl using following conditions: 1X PCR-buffer (Perkin Elmer, USA), 200 µM dNTP's (Pharmacia Biotech, USA), 0.5 µM 35S-primer (5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'), 0.5 µM event-specific-primer (5' CCTTCAATTTAACCGATGC 3') and 25 ng of DNA. The PCR reactions were performed using the following cycle profile. Step 1 : initial denaturation at 95°C for 3 min. ; step 2 (34 cycles) : 20s at 95°C, 40s at 53°C and 40s at 72°C ; step 3 : 3 min. at 72°C. After the amplification 5 µl of the reaction mix was separated on a 1.5 % agarose gel and stained with ethidium bromide and visualised using a UV transilluminator.

Results and discussion

The proposed strategy was tested on a glyphosate tolerant soybean line that was constructed by Monsanto using the particle acceleration method. This RoundUp Ready soybean line 40-3-2 was

characterised at the molecular level (Padgette *et al.*, 1995). The results of this characterisation showed that line 40-3-2 contains part of the CaMV 35S promoter, the EPSPS chloroplast transit peptide from *Petunia hybrida*, the CP4 EPSPS gene and a portion of the 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene terminator. Line 40-3-2 was selected because this line carried a single genetic insert (Fig. 1).

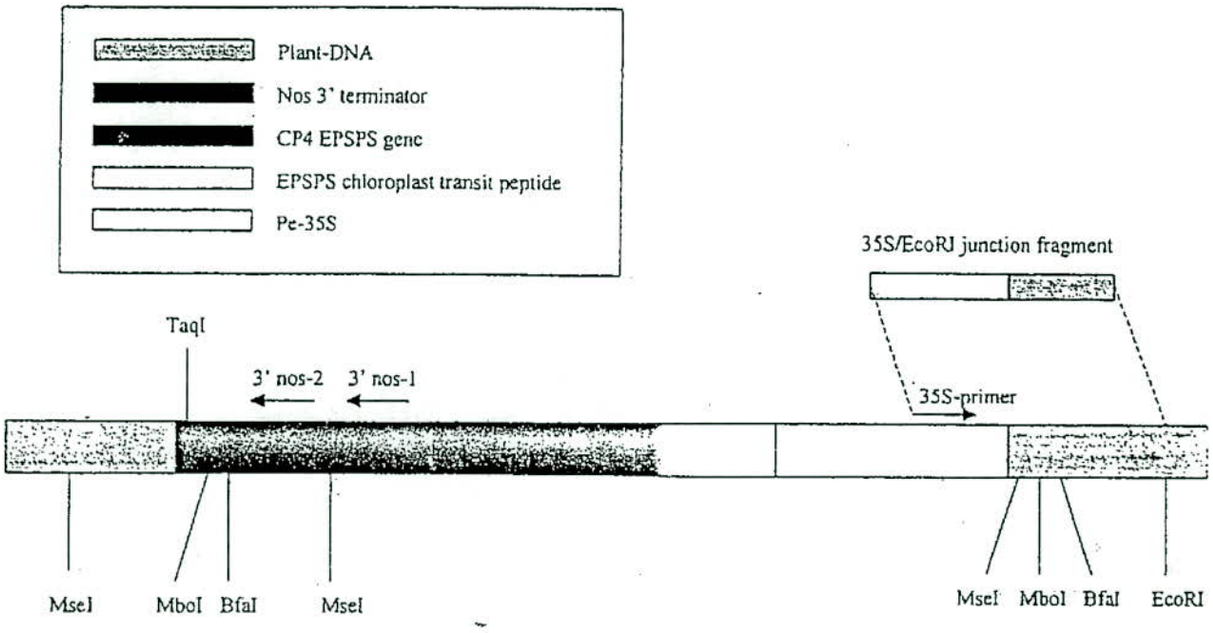


Fig. 1. Schematic diagram of inserted DNA present in RR soybeans (Padgette *et al.*, 1995).

To test our strategy we focussed on the 35S promoter region and the nos 3' terminator region because these two genetic elements flank the transgene and form the boundaries with the plant-DNA. In this way anchor-primers homologous to these two regions in combination with one of the 5 restriction enzymes and the matching adapter-primers would in all probability give us an anchored-PCR fragment that spans the border plant-DNA/inserted DNA. Because all tetracutters used had a recognition site between the 3'nos-1-primer and the insert border our work initially concentrated on the 35S junction fragment. Eventually the isolation of 4 different junction fragments spanning the junction 35S promoter/plant-DNA: 35S/MseI, 35S/MboI, 35S/BfaI and 35S/EcoRI, was successful. As could be expected the 35S/EcoRI fragment was the longest fragment. This 383 bp long 35S/EcoRI fragment was made up of 173 bp plant-DNA and 210 bp insert-DNA. We used this sequence information to design a primer that was situated in the plant-DNA. This newly designed event-specific primer and the 35S-primer make up a primer pair that should give a 360 bp amplicon when used to identify RR soybean DNA. Indeed the new primer pair was tested and gave a 360 bp fragment (Fig.2).

In the future this new primer pair will be tested on different foods containing soy (Messens *et al.*, in this volume). Also, the sequence of the 35S/EcoRI fragment will be used to develop a new line specific primer pair that will give a shorter amplicon (+/- 180 bp) to be able to identify RR soy DNA in processed foods in which the existing DNA could be fragmented (Hupfer *et al.*, 1998).

In the near future we will characterise and sequence also the 3'nos plant junction fragment. A new primer, the 3'nos-2 primer, homologous to the 3'nos terminator region, is being designed. As there is no MseI restriction site between the border and this new primer it should be possible to

299 302 315

amplify a 3'nos junction fragment. Once this junction fragment is isolated and sequenced, a prime specific for the plant-DNA adjacent to the nos 3' terminator will be developed. A combination c both event-specific-primers will be used in the future to amplify the pre-insertion locus in the wil type soybeans. A comparative analysis between the pre-insertion locus and the locus structure of th transgene locus could give us valuable information concerning the substantial equivalence betwee wild type and GMO.

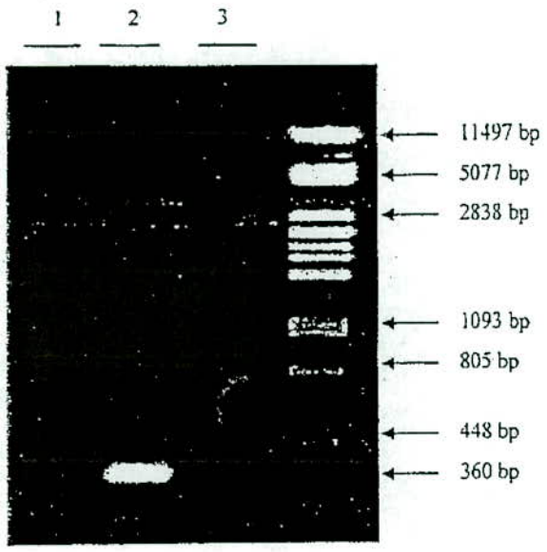


Fig. 2. Agarose gel analysis of line specific RI soy PCR products. Lane 1, line specific RR so PCR on non-transgenic soy DNA. Lane 2, lin specific RR soy PCR on transgenic RR soy DNA Lane 3, negative control: line specific RR so PCR on sample without DNA.

References

Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel KH (1998) Detection of the genetic modification in hea treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 206:20: 207

Meyer R (1995) Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels der Polymeras Kettingreaktion (PCR) am Beispiel der Flavr Savr™-tomate. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 201:58: 586

Padgette SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Oteror Y Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB and Kishore GM (1995) Developmer Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. Crop Sci. 35:145 1461

Pietsch K, Waiblinger HV, Brodmann P, Würz A (1997) Screeningverfahren zur Identifizierur "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. Deutsche Lebensmittel Rundschau. 93(2):3 38

270
1 316

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor
EMILIO FERRERO
Monsanto Technology
(Apoderado)

ASUNTO

Radicación	02-49630
Trámite	002
Evento	001
Actuación	430
Oficio	2757
Folios	

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 66 a 148) y las reivindicaciones 1 a 17(folios: 182 a 186).

La presente solicitud reivindica prioridad Americana Nº 60/297,406 de 11 de junio de 2001 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

La presente solicitud se refiere a una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985 depositada como ATCC PTA-2516, y que comprende un inserto Cry2Ab y por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada a partir del grupo de SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o CryA2b más las secuencias SEQ ID No 11 y SEQ ID No 12.

Así mismo se reclama la célula de planta en la que se puede obtener un amplicón al emplear los cebadores SEQ ID 34, o SEQ ID 36. También se reivindica el método para producir una planta de algodón resistente a herbicidas que comprende cruzar una planta resistente a herbicidas con una no resistente y seleccionar la progenie.

También hacen parte de la invención las secuencias de ADN aisladas que comprenden las SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18. Además se reivindican métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 en el tejido de algodón que comprende la selección de cebadores que hibridizan sobre secuencias que flanquean la secuencia de inserción MON15985 y la amplificación del segmento de interés. Por último se reclaman los kits de detección de ADN que comprenden las sondas que hibridizan con las secuencias SEC ID No 14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o que contienen los cebadores que hibridizan con las secuencias flanqueantes de MON 15985.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC A01H 1/006

En el concepto técnico 720, en virtud del articulo 45 de la D.486 se le indicó al solicitante que debía dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Claridad de la solicitud:

El artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

En todo el capítulo reivindicatorio se emplean términos imprecisos como al menos o una fracción de..., que no limitan el alcance de la protección solicitada.

La reivindicación 1 reclama una célula derivada de la planta PTA-2516. Sin embargo, como se mencionó en el concepto técnico previo, las plantas no son patentables a la luz de la D.486, por lo que una célula caracterizada por un elemento no patentable no estaría correctamente definida.

La reivindicación 4 reclama un inserto de una célula vegetal resistente a insecto definiéndolo por que es capaz de producir un amplicón empleando determinados cebadores. Un inserto de ADN debe definirse única y exclusivamente por su secuencia de nucleótidos, no por el resultado que se espera alcanzar con el. Lo mismo sucede con la reivindicación 9 que reclama una molécula aislada de ADN que cuando se utiliza en un procedimiento se diagnóstica MON15985, caracterizando la molécula reclamada no por su secuencia sino por el resultado esperado.
Las reivindicaciónes 10-11 reclaman una molécula aislada (o fragmento) que comprende la secuencia de flanqueo del evento MON15985.

Todas las anteriores cláusulas además de no definir claramente el objeto reclamado mediante sus características técnicas, pueden estar reivindicando moléculas completamente diferentes y que no guardan unidad de invención entre ellas. El ser usadas con un mismo objetivo no las relaciona estructuralmente y por ende no pueden ser consideradas como un único objeto de invención.

El kit reclamado en la cláusula 16 no define los elementos que lo componen mediante sus características propias si no por el resultado esperado cómo es que se unan a determinadas secuencias. . Así que la reclamación de un kit con elementos indefinidos y caracterizados por el resultado a alcanzar es amplia, especulativa y no permite determinar con exactitud cual es la materia a proteger. Esto ya se había mencionado con anterioridad.

De acuerdo con lo anterior, las reivindicaciones 1,4 ,9-11,16 en mención no cumplen

con el requisito de claridad definido en el artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones.

Evaluación de la Unidad de Invención:

El artículo 25 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo."

Las reivindicaciones 2 a 3 reclaman una célula vegetal resistente a insecto que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12.

El elemento común entre las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 es que todas ellas pueden acompañar al gen Cry2Ab en el inserto empleado para la transformación de las plantas de algodón. Sin embargo, este gen ya es bien conocido en la obtención de plantas transgénicas resistentes a insectos y por lo tanto no puede ser considerado como el elemento común inventivo que vincule a todos los insertos de ADN con los que se pueden transformar las células reivindicadas y en ese sentido las diferentes células caracterizadas mediante distintos insertos posibles no guardan unidad de invención entre ellas.

Por lo tanto, es importante resaltar que además de estar ligadas al gen de la endotoxina, las secuencias mencionadas arriba deberían presentar tanto una estructura común como una misma actividad, para poder considerarlas como un único objeto de invención. En este sentido, sería estrictamente necesario que dicha estructura común representara verdaderamente un salto cualitativo sobre la formulación de la regla técnica. De lo contrario, no existiría una característica común nueva e inventiva que pudiese vincular a todas las posibles invenciones aquí reivindicadas, pero sobretodo ninguna de las combinaciones posibles Crya2b-SEQID No 14 a 17 sería patentable, por que no cumpliría con el requisito de nivel inventivo.

De cuerdo con lo anterior las clausulas 2 a 3 y dependientes no cumplirían con el requisito de Unidad de Invención exigido en el artículo 25 de la Decisión 486.

Es una invención:

El artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "No se consideran invenciones: a) los descubrimientos, las teorías científicas y los métodos matemáticos; b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural; c) las obras literarias y artísticas o cualquier otra protegida por el derecho de autor; d) los planes, reglas y métodos para el ejercicio de actividades intelectuales, juegos o actividades económico-comerciales; e) los programas de ordenadores o el soporte lógico, como tales; y, f) las formas de presentar información."

La reivindicación 7 reclama el método de producción de una planta resitente a insectos que comprende las etapas de: a)el cruce de una planta resistente con una no resistente, b)contener al menos una planta derivada del cruce y c)seleccionar la progenie.. Es claro que el cruce entre plantas implica necesariamente la etapa de reproducción, que constituye indiscutiblemente un proceso esencialmente biológico, independientemente si este se efectúa entre organismos modificados genéticamente o no; de igual forma que las plantas y sus células se generan mediante procesos

biológicos naturales en donde los resultados a obtener no son inesperados. De acuerdo con lo anterior se conceptúa que método reclamado al depender fundamentalmente de procedimientos esencialmente biológicos que pueden presentarse espontáneamente en la naturaleza sin la intervención del hombre, se encuentra dentro del alcance del artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones y por lo tanto no puede ser considerado como una invención.

Por otra parte, las reivindicación 8 reclaman secuencias de ADN aisladas, que constituirían materia existente en la naturaleza, no modificada por el hombre y por ende que no puede ser considerada invención a la luz del literal b) del artículo 15 de la Decisión 486.

Determinación del estado de la técnica:

El artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de Patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40".

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 11 de junio de 2001, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	Evaluation of BollgardII (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field eficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab"	JAN. 9-13, 2001,
2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	Field efficacy of cotton expressing tow insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis"	JAN. 9-13, 2001,

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	"Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas"	JAN. 9-13, 2001
4	ACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 815-819	Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm , Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhous studies"	JAN. 9-13, 2001
5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, no. 3, pages 752-760	"Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" (2001-06), ,	June 2001
6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	: "Development Of A Line Specific GMO Detection Method A Case Study"	1999-09-22
7	WO0026371	Methods For Transforming Plants To Express Bacillus Thuringiensis Delta-Endotoxins.	11/05/2000

Evaluación de los requisitos de Patentabilidad:

El Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina el cual establece: "Los Países Miembros otorgarán Patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

Evaluación de Nivel Inventivo:

El artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Las reivindicaciones 1 a 3 y dependientes reclaman una célula vegetal derivada de una planta resistente a insectos (PTA 2526 - evento MON 15985) caracterizada en que comprende un inserto del gen CryA2b acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12.

El problema técnico a resolver con la presente invención es la generación de plantas de algodón resistentes a insectos incluidas las células de plantas transformadas con genes codificantes para proteínas con actividad insecticida. Los documentos D1 a D5 divulgan el evento MON15985, elemento central de la presente invención, bajo diferentes nombres (DP50BII, Bolgard II, DPL15985, DP50Bx) que corresponden específicamente a plantas transgenicas de algodón resistentes a insectos que expresan las endotoxinas de Bacillus thuringiensis. En esos mismos documentos se enseña que dichas plantas pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. D7 resalta la combinación de las dos endotoxinas en un mismo OGM.

La presente solicitud difiere de las anterioridades en que indica un evento de inserto particular para el gen Crya2b en algodón. Sin embargo, de la lectura de la presente solicitud no se encuentra evidencia que dicho inserto posea un efecto técnico que supere los eventos conocidos en el estado del arte. Entonces, el problema a resolver con la presente solicitud sería generar plantas de algodón alternativas que comprendan los genes CryAb y CryAc para conferir resistencia a insectos. No obstante, este evento de inserción representa una modificación que no es significativamente superior al estado del arte, dado que es una selección arbitraria de una inserción aleatoria a la cual hubiera podido llegar cualquier persona versada en la materia sin ninguna actividad inventiva (la posición de la inserción no fue planeada con el objeto de obtener resultados inesperados)

Las reivindicaciones 12 a 15 reclaman métodos para detectar la inserción de MON15985, que consisten en la amplificación simple de determinados segmentos del genoma empleando cebadores seleccionados y examinando el amplicón obtenido; así como métodos que emplean el principio de hibridización para detectar ciertas regiones del genoma complementarios a ciertas sondas escogidas.

El documento D6 divulga emplea un procedimiento basado en PCR empleando primers contra las secuencias que flanquean el inserto. Apartir del anterior documento la selección de primers que representan una selección arbitraria entre un número de alternativas y el uso de los mismos para identificar secuencias de diagnóstico y su empleo en la identificación del evento por hibridización no representa un salto cualitativo en la formulación de la regla técnica.

Así que, a pesar que se efectué una selección de determinados cebadores o sondas, el método no va a difererir de los empleados constantemente en los ensayos de caracterización molecular. De hecho, cualquier técnico versado en la materia, como actividad de rutina selecciona primers y sondas que puedan hibridizar son sus secuencias target. De esta forma, los métodos reclamados más bien representan el uso de las sondas y cebadores seleccionados en métodos corrientes, pero que no le atribuyen ninguna ventaja técnica sobre los que ya existen en el estado de la técnica.

Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo
2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo
3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo
4	ACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 815-819	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo
5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, no. 3, pages 752-760	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo
6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	12-15 y dependientes	Nivel Inventivo
7	WO0026371	1 a 3 y dependientes	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 01 MAR. 2007

CONCEPTO TÉCNICO Nº: 321	**EXAMINADOR TÉCNICO Código Nº: 202063**	**2007-02-22**

181

310

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES 2000-F03

1 SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2 SOLICITANTE

Nombre: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Teléfono: 546 09 70 **Fax:** 547 31 70
E-mail: clientes@camyp.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 211 86 50

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 438.019 TP 31.929

4 Número de expediente: 02049630

5 Descripción de la corrección o modificación solicitada:
Se presenta nueva figura 1 y nuevo capítulo reivindicatorio con 17 reivindicaciones sobre el cual solicito se efectue el examen de patentabilidad de la presente solicitud.

6 Comprobante de pago No. 06 – 71.845 **Fecha:** 18 de septiembre de 2006

7 Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa por $ 95.000

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8 NOMBRE: EMILIO FERRERO **FIRMA:** _____

C.C. 438.019 de Usaquén **T.P.A.** 31.929

ZCA

REIVINDICACIONES DE REEMPLAZO

38-21 (52211A) CO/11899 0232.00CO00

1. Una célula vegetal de algodón resistente a insectos, derivada de una planta de algodón, en donde la semilla de dicha planta de algodón se ha depositado con el American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-2516.

2. Una célula de planta vegetal resistente a insecto, que comprende incorporada en el genoma de la célula de la planta un inserto que codifica Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO.14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO 16: SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18.

3. Una célula de planta de algodón resistente a insecto, que comprende incorporada en un ADN de genoma de célula que codifica Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.

4. El insecto resistente a la célula vegetal de algodón de la reivindicación 2 o 3, en donde el ADN genómico de dicha célula vegetal de algodón es capaz de producir al menos un amplicón de aproximadamente 1.5 kb utilizando los iniciadores que tienen la secuencia de la SEQ ID NO.34 y SEQ ID NO: 36.

5. La célula vegetal de algodón resistente a insecto de la reivindicación 4, en donde dicha célula vegetal de algodón es homocigota para el insecto Cry2Ab.

312
183
279

6. La célula vegetal de algodón resistente a insecto de la reivindicación 4, en donde dicha célula vegetal de algodón es heterocigota para el insecto Cry2Ab.

7. Un método para producir una planta de algodón resistente a insecto que comprende:

a) Cruzar una planta de algodón resistente a insecto, que comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y la SEQ ID NO: 18, con una planta de algodón diferente;

b) contener al menos una planta de progeniA derivada del cruce de (a); y

c) seleccionar la progenie que es resistente a insecto y comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18.

Método Essencial

8. Una molécula de ADN aislada que comprende la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

9. Una molécula de ADN aislada, que comprende al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 O la SEQ ID NO: 12 o sus complementos, y que comprende una secuencia de unión entre el ADN de insecto y de flanqueo del MON15985 que cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación del ADN o en un procedimiento de hibridización de ADN, se diagnostica para MON 15985 y la progenia de ésta.

10. La molécula de ADN aislado de la reivindicación 9 que comprende la SEQ ID NO: 11 o su complemento, o una porción de la SEQ ID NO: 11 o su complemento que comprende una secuencia de unión entre el ADN inserto y de flanqueo del MON15985.

11. La molécula de ADN aislado de la reivindicación 9 que comprende la SEQ ID NO: 12 o su complemento, o una porción de la SEQ ID NO: 12 o su complemento que comprende una secuencia de unión entre el ADN de inserto y de flanqueo del MON15985.

12. Un método para detectar la presencia de la inserción de MON15985 en tejido de algodón que comprende:

a) seleccionar un par iniciador que comprende cada uno al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 en donde cada miembro del par está en lados opuestos de una secuencia diagnóstica para dicha inserción de MON15985;

b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con dicho par iniciador;

c) Desarrollar amplificación de ADN y detectar un amplicón que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

13. Un método para detectar la presencia de la inserción de MON15985 en el tejido de algodón que comprende:

a) seleccionar un par iniciador que comprende cada uno al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 en donde cada

miembro del par está en lados opuestos de una secuencia diagnostica para dicha inserción de MON15985;

b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con dicho par iniciador;

c) desarrollar una amplificación de ADN y detectar un amplicón que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12.

14. El método de la reivindicación 12 o 13 en donde dicho par iniciador se selecciona del grupo que consiste la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36.

15. un método para detectar la presencia de la inserción MON15985 en tejido de algodón que comprende:

a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con una sonda de poli nucleótido, en donde dicha sonda de poli nucleótido de hibridiza bajo condiciones de hibridización estrictas con una o más secuencias de ADN seleccionadas del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO. 18;

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

c) detectar la hibridización de la sonda.

16. El kit de detección de ADN que comprende una sonda de poli nucleótido, en donde dicha sonda de polinucleótido hibridiza bajo condiciones de hibridización estrictas con una o más secuencias de ADN seleccionadas del

315 186 232

grupo que consiste de la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18.

17. Un kit de detección de ADN que comprende una molécula de ADN aislado que comprende al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o LA SEQ ID NO: 12 o sus complementos, y que comprende una secuencia de unión entre el ADN de inserto y de flanqueo de MON15985.

316

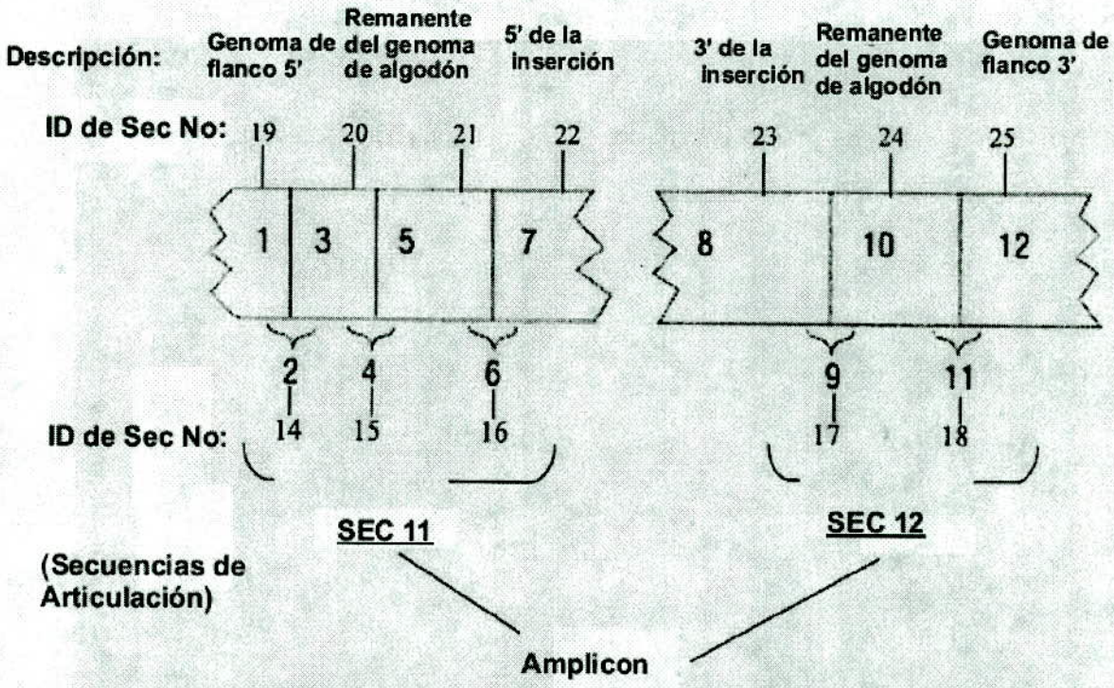


FIG 1
(Modificada)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020/

Bogotá, D. C.

Doctor
EMILIO FERRERO
Monsanto Technology
(Apoderado)

ASUNTO

Radicación	02-49630
Trámite	002
Evento	001
Actuación	430
Oficio	
Folios	12665

Como resultado de la búsqueda de anterioridad y con fundamento en el artículo 46 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

El artículo 46 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "La oficina nacional competente podrá requerir el informe de expertos o de organismos científicos o tecnológicos que se consideren idóneos, para que emitan opinión sobre la patentabilidad de la invención. Asimismo, cuando lo estime conveniente, podrá requerir informes de otras oficinas de propiedad industrial.

"De ser necesario, a efectos del examen de patentabilidad y a requerimiento de la oficina nacional competente, el solicitante proporcionará, en un plazo que no excederá de 3 meses, uno o más de los siguientes documentos relativos a una o más de las solicitudes extranjeras referidas total o parcialmente a la misma invención que se examina:
"...b) copia de los resultados de exámenes de novedad o de patentabilidad efectuados respecto a esa solicitud extranjera;...
Si el solicitante no presentara los documentos requeridos dentro del plazo señalado en el presente artículo la oficina nacional competente denegará la patente."

Como resultado de la búsqueda de anterioridades se encontró que la solicitud en estudio corresponde con la solicitud europea y publicada con el número WO02100163. El análisis del examen de la solicitud extranjera establece como documentos que afecta la patentabilidad del objeto de la solicitud colombiana los siguientes:

ADAMCZYK, J.J., ET AL.: "Evaluation of BollgardII (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field eficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13, 2001, vol. 2, 2001, pages 835-837, XP008054531 D1

AKIN, D.S., ET AL.: "Field efficacy of cotton expressing tow insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13 2001., vol. 2, 2001, pages 1041-1043, XP008054529 D2

NORMAN, J.W., ET AL.: "Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13 2001., vol. 2, 2001, pages 833-835, XP008054530 D3

JACKSON, R.E., ET AL.: "Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm , Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhous studies" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13, 2001., vol. 2, 2001, pages 815-819, XP008054533 D4

STEWART S D ET AL: "Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 94, no. 3, June 2001 (2001-06), pages 752-760, XP008054502 ISSN: 0022-0493 D5

WINDELS P ET AL: "DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD A CASE STUDY" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, GENT, BE, vol. 64, no. 5B, 22 September 1999 (1999-09-22), pages 459-462, XP001032975 ISSN: 0368-9697 D6

Con el fin de agilizar el trámite, le sugerimos que junto al documento solicitado presente los argumentos que usted considere necesarios para demostrar que este artículo no afecta los requisitos de patentabilidad de su invención.

Dado que el artículo mencionado es el resultado del examen de patentabilidad efectuado a la solicitud extrajera que corresponde con la solicitud colombiana y habiendo sido imposible la consecución de dicho documento, esta Oficina requiere que el solicitante proporcione en un plazo que no excederá de 3 meses, la copia del artículo mencionados anteriormente. Nos permitimos recordarle que si el solicitante no presentara los documentos requeridos dentro del plazo señalado la oficina nacional competente denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e del capítulo quinto (5), del título primero de la circular única número 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E).

02 NOV. 2006

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha _____

CONCEPTO TÉCNICO Número: 1696	EXAMINADOR TÉCNICO Código # 202063

CAVELIER
ABOGADOS

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

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

191 319 287

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 02-049630- -00010-0000
Fec: 2007-02-01 16:23:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 29

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación: 444

Referencia : Expediente No. 02.049.630

Asunto : Solicitud de patente para **PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO**

Solicitante : MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Fecha de solicitud : 11 de junio de 2002.

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **12665** notificado por fijación en lista del 02 de noviembre de 2006, y atentamente presento junto con este escrito los siguientes artículos:

- ADAMCZYK, J.J., ET AL.: "Evaluation of Bollgardll (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field efficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13, 2001, vol. 2, 2001 pages 835-836, XP008054531.

- AKIN, D.S.,ET AL.: "Field efficacy of cotton expressing two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13, 2001, pages 1041-1043 XP008054529.

320
1 de 2
280

- NORMAN, J.W., ET AL: "Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13 2001, vol. 2, 2001, pages 833-835, XP008054530.

- JACKSON, R.E., ET AL: "Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm, Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhouse studies" PROCEEDINGS OF THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, HELD JAN. 9-13, 2001 vol. 2, 2001, pages.815-818, XP008054533.

- STEWART S D ET AL: "Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 94, no. 3, June 2001 (2001-06), pages 752-760, XP008054502 ISSN: 0022-0493.

- WINDELS P ET AL: "DEVELOPMENT OF A LINE SPECIFIC GMO DETECTION METHOD A CASE STUDY" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, GENT, BE, vol. 64, no. 5B, 22 September 1999 (1999-09-22), pages 459-462, XP001032975 ISSN: 0368-9697.

Respetuosamente le informo al Despacho, que de acuerdo con la información recibida de nuestro cliente, el artículo de ADAMCZYK, J.J., ET AL. y el de JACKSON, R.E., ET AL. cuenta con dos (2) hojas y con cuatro (4) hojas respectivamente; ya que las páginas faltantes corresponden a publicidad.

Con el fin de demostrar que los documentos requeridos por su Despacho no afectan la patentabilidad de la presente invención, considero fundamental poner de presente inicialmente cuál es el objeto de esta última.

Así se debe tener en cuenta que la presente invención reivindica (i) células transgénicas de una planta de algodón que comprenden un inserte que codifica Cry2Ab y las secuencias de unión de las SEQ ID NOs: 14-18; (ii) las sondas y los iniciadores que son útiles para detectar tal evento de inserción; (iii) los métodos para detectar tal evento de inserción; (iv) y los kits de detección de ADN que comprenden las sondas y los iniciadores reivindicados. Vale la pena resaltar que las características técnicas esenciales de la presente invención son las secuencias de unión únicas, más específicamente las secuencias de amplicón únicas que son diagnósticas para el evento de inserción objetivo.

321
AGB
239

Así entonces, toda vez que tal evento de inserción involucra secuencias únicas que no están descritas ni sugeridas en el estado de la técnica como se demostrará a continuación, la patentabilidad de la presente invención, que específicamente reivindica las secuencias únicas anteriormente mencionadas, no se ve afectada por los artículos citados. Veamos;

Los artículos de **ADAMCZYK ET AL.**, **AKIN ET AL.**, **NORMAN ET AL.**, y **JACKOSN ET AL.** no revelan secuencias que sean diagnósticas para la inserción MON15985. Adicionalmente, no suministran ninguna descripción de las secuencias de unión SEQ ID NOs: 14-18 o las secuencias de amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12. Aunque, los artículos anteriores emplean términos como BollgardII®, DP50BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX, los mismos son simplemente términos arbitrarios exentos de cualquier característica técnica.

Por lo tanto, toda vez que las características técnicas únicas para la inserción MON15985 no son divulgadas en ninguno de los artículos anteriores, los mismos no afectan la patentabilidad de la presente invención.

Por su parte, el artículo de **STEWART ET AL.**, describe el impacto del algodón transgénico que expresa tanto las endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis* sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de Lepidóptera. Aunque menciona que el MON15985 es uno de los cultivares primarios utilizados en sus ensayos, este artículo no describe ninguna secuencia que sea diagnóstica para la inserción MON15985.

Así entonces, al no divulgar ninguna descripción sobre las secuencias de unión de las SEQ ID NOs. 14-18 o las secuencias de amplicón de la SEQ ID NOs: 11 y 12, ni ninguna de las características únicas para la inserción MON15985, este artículo tampoco afecta la patentabilidad de la presente invención.

CAVELIER
ABOGADOS

144 322
290

Finalmente, el artículo de **WINDELS ET AL.**, describe un método PCR para detectar el ADN de fríjol de soya RoundUP Ready™ en una forma de línea específica. Este artículo no enseña ni sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que involucre las secuencias de unión de las SEQ ID NOs: 14-18, o las secuencias de amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12. Así entonces, toda vez que las características técnicas específicas anteriormente mencionadas para la inserción MON15985 no son divulgadas en este artículo, aunque el mismo suministre un método PCR para detectar una línea especifica de organismos genéticamente modificados (OGM), y toda vez que el mismo no enseña ni sugiere un método para detectar el evento de inserción de algodón, tal y como se reivindica en la presente solicitud, el mismo no puede tampoco afectar la patentabilidad de la presente invención.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las peticiones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá,
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
003 NNJ/NNJ/ID-000309/WPMEMOLE
Cns M-2007-00001455

323

CAVELIER
ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 02-049630- -00012-0000
Fecha: 2007-06-28 16:17:54 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 467 SOLICIPRORROGA Folios: 2

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 001
Evento : 002
Actuación : 467

Referencia : Expediente No. 02.049.630
Asunto : REGISTRO - PATENTE **PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DEL MISMO.**
Solicitante : MONSANTO TECHNOLOGY LLC
Fecha de Solicitud : 11 de junio de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, como apoderado del solicitante, en el asunto antes identificado, atentamente solicito a Usted se sirva concederme un plazo de treinta (30) días, para atender el oficio No. **2757** notificado por fijación en lista del 1 de marzo de 2007.

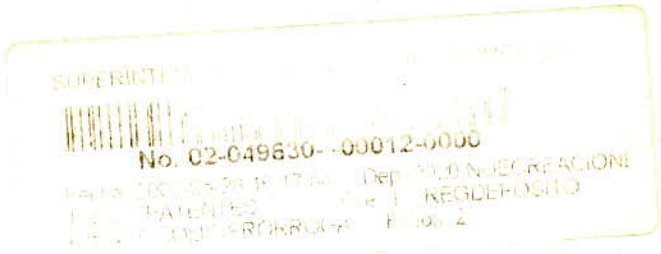
2. Presento junto con este memorial, el recibo expedido por el Fondo Especial de la Superintendencia de Industria y Comercio, en donde costa el pago hecho por valor de $72.000 en conformidad con lo dispuesto en la resolución No. 36155 del 28 de diciembre de 2006.

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746 801 002 1
NNJ\ASG\ID-102085\WPC12746
No. M-2007-102085\NNJ

~~325~~ 324



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 35,369
FECHA : MAYO 7 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55800353	07/05/2007	43,849,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	31 PRORROGA DE TERMINOS	72,000.00
		TOTAL : $	72,000.00

SON: SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO 12746 801 0021

CAVELIER
ABOGADOS

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

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

326
325

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

...A Y COMERCIO
No. 02-049630- -00013-0000
Fecha: 2007-07-12 16:57:00 Dep: 2020 NUECREACIONE
Trd: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 18

Trámite : 002 **Evento : 001** **Actuación : 444**

Referencia	:	Expediente No. 02049630
Asunto	:	Solicitud de patente para **PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO.**
Solicitante	:	**MONSANTO TECHNOLOGY LLC**
Fecha de Solicitud	:	11 de Junio de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **2757** notificado por fijación en lista del 1 de marzo de 2007.

2. Mediante memorial de fecha 28 de mayo de 2007 solicité un plazo de 30 días para atender el Oficio No. **2757**.

3. Mediante el Oficio No. **2757** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

3.1. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

Para subsanar las objeciones que sobre claridad hizo su Despacho, presento nuevo pliego reivindicatorio con 17 reivindicaciones en el cual se han hecho los cambios sugeridos por su Despacho, los cuales delimitan claramente la materia reivindicada. Las modificaciones efectuadas al capítulo reivindicatorio fueron las siguientes:

- La nueva reivindicación 4 se refiere únicamente al evento de algodón MON15985, el cual tiene un inserto que codifica el Cry2Ab, así como un inserto que codifica el Cry1Ac. De esta manera y siguiendo la sugerencia del Señor Examinador, la invención es reivindicada por una característica técnica y no por el resultado que se espera alcanzar con aquella. El soporte para esta reivindicación se encuentra en la página 18, primer párrafo y en la página 20.

- La antigua reivindicación 4 se ha eliminado del pliego reivindicatorio.

- Las reivindicaciones 8 a 11 se han corregido para referirse a la secuencia o secuencias de conexión específicas. A este respecto, es importante mencionar que las moléculas de ADN son sondas o cebadores útiles para distinguir la inserción MON15985 de la secuencia no trasformada, y no modificada nativa, lo cual es plenamente soportado por la descripción.

- Las reivindicaciones 12 y 16 se han corregido para referirse a la secuencia de conexión específica.

A este respecto, amablemente reiteramos que la nueva reivindicación 16 y su dependiente están dirigidas a un kit para la detección de ADN que comprende o un polinucleótido que hibridiza a una o más secuencias de unión o al menos 15 nucleótidos de las secuencias del amplicón o complementos de los mismos. Es así como un experto en el arte entendería que la molécula de ADN que se hibridiza bajo condiciones rigurosas con

una o más de las secuencias de conexión especificadas tendrían una secuencia que es complementaria a una o más secuencias de conexión, por lo cual, dichas reivindicaciones se caracterizan por sus características técnicas.

- Respetuosamente ponemos de presente que los términos "al menos" y "una porción de" cuando se refieren a una sonda o cebador que es específico para detectar la inserción MON15985, no son términos ambiguos para un experto en la materia ya que los mismos son rutinariamente empleados en este campo de la tecnología.

- Con respecto a la reivindicación 1, cordialmente ponemos de presente que no existe restricción alguna en la ley que prohíba caracterizar un elemento patentable como lo son las células de plantas transgénicas con elementos no patentables, mientras las mismas cumplan el requisito de ser novedosas, tener nivel inventivo y aplicación industrial, como sucede en el presente caso.

Con las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio quedan subsanadas las objeciones que por claridad hizo su Despacho al mismo ya que ahora cumple con las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486.

3.2. UNIDAD DE INVENCIÓN

Su Despacho establece que la solicitud carece de unidad de invención, ya que afirma que la SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 11 y 12 deben tener la misma actividad y la misma estructura común, y que la estructura común debe representar una mejora cualitativa sobre la formulación de la regla técnica.

En respuesta, presentamos los siguientes comentarios:

328
329

Las SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, y 18 son secuencias de conexión y las SEQ ID NOs: 11 y 12 son secuencias amplicón que son diagnósticas para la inserción MON15985. La Figura 1 (anexo 5.2) ilustra claramente la relación entre estas secuencias.

A este respecto, es importante establecer que el evento de algodón MON15985 contiene un grupo seleccionado de marcadores, (es decir las secuencias de conexión o amplicón) como resultado del inserto de ADN transgénico en el genoma. La detección de cualquiera de estos marcadores en una muestra conocida por surgir de la semilla de algodón y otros tejidos de algodón es diagnóstica para la presencia del evento MON15985 en esa muestra.

Así entonces, las secuencias están todas físicamente ligadas (Figura 1), ya que la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN algodón es diagnóstica de la presencia del evento MON15985 en esa muestra, y necesariamente por lo tanto, la presencia de cada una de las otras secuencias también. Por lo tanto, dichas secuencias se deben examinar en conjunto como una simple invención.

Con respecto a la mejora cualitativa sobre la formulación de la regla técnica, respetuosamente ponemos de presente que las plantas de algodón MON15985 de mi representada suministran ventajas agronómicas a un cultivador, toda vez que el mismo consigue un mayor rendimiento de las plantas de algodón transformadas con genes de *B. thuringiensis* (es decir *cry2Ab* y *cry1Ac*) que son complementarias una a la otra. Tal evento de transformación da como resultado una (i) disminución en la probabilidad del desarrollo de una población de plagas de insectos que sean resistentes a la o las proteínas de cristal de *B. thuringiensis* (es decir insecticida), (ii) suministra un mecanismo interno para manejar a uno o a ambos de los insecticidas expresados en las plantas, y (iii) suministra medios para un acanalamiento limpio de las semillas en el comercio.

Teniendo en cuenta los argumentos expuestos anteriormente, es evidente que existe unidad de invención entre las SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 11 y 12 y que estas

secuencias se deben examinar juntas, toda vez que las SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, y 18 son secuencias de conexión y las SEQ ID NOs: 11 y 12 son secuencias amplicón que son diagnosticas para la inserción MON15985, y por lo tanto, la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra necesariamente implica la presencia de las otras.

3.3. ES UNA INVENCIÓN

El Examinador sostiene que la reivindicación 7 se relaciona con un proceso esencialmente biológico y que por lo tanto de acuerdo con el artículo 15. de la Decisión 486 no es patentable.

A este respecto, respetuosamente reiteramos que la reivindicación 7 se refiere a un método para producir una planta de algodón al cruzar una planta resistentes a insectos que comprende las secuencias de nucleótido de las SEQ ID NOs: 14-18 con una planta de algodón diferente, obteniendo al menos una planta de progenie, para luego seleccionar dicha progenie, que son las secuencias resistentes a insecto y comprenden las secuencias de nucleótido de las SEQ ID NOs: 14-18.

En vista de lo anterior, es importante establecer que el método reivindicado involucra la etapa de seleccionar progenie que comprende las secuencias de nucleótido de las SEQ ID NOs: 14-18, cuyas secuencias son secuencias novedosas de ADN de conexión genómico-transgén debido a la inserción del transgén. Esta etapa ciertamente requiere de intervención técnica humana, en razón a que no todas las plantas de progenie tendrían la inserción MON15985 de la presente invención y **una etapa de análisis se requiere para seleccionar las plantas de progenie que tienen la inserción MON15985**. Así entonces, el método reivindicado no es un proceso esencialmente biológico como lo asevera el Examinador, y por lo tanto el mismo no esta incurso dentro del alcance de la excepción de patentabilidad del artículo 15 de la Decisión 486.

330
331

Adicionalmente, el Examinador sostiene que la reivindicación 8 (nueva reivindicación 11) no es patentable de acuerdo con el literal b) del articulo en mención, toda vez que la misma se refiere a una molécula de ADN aislada que constituye materia ya existente en la naturaleza.

A este respecto, ponemos de presente que nos encontramos en desacuerdo, debido a que la misma está dirigida a la molécula de ADN aislada que comprende la **combinación** de las cinco únicas secuencias de conexión de las SEQ ID NOs: 14-18. Tal combinación resulta del evento MON15985 de la presente invención **y por ende no pre-existe en la naturaleza**. El evento MON15985 involucra modificaciones genéticas y no ocurre naturalmente, por lo cual la reivindicación 8 dirigida a la molécula de ADN que resulta del evento MON15985 es patentable ya que la misma no esta incursa en la excepción de patentabilidad del literal b) del articulo 15 de la Decisión 486.

3.4. NIVEL INVENTIVO

Ese Despacho afirma que los documentos **D1 a D5 y D7** afectan el nivel inventivo de las reivindicaciones 1-3 y las dependientes de estas (es decir las reivindicaciones 1-6)de la presente invención, con lo cual estamos en desacuerdo por los argumentos expuestos a continuación. Veamos:

D1 a D4 no describen ninguna secuencia que sea diagnóstica para la inserción MON15985, objeto de la presente invención. Esto es, no se suministra ninguna descripción sobre las secuencias de conexión de las SEQ ID NOs: 14-18 o las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y12. Se cree que al referirse simplemente a los términos BollgardII®, DP40BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX, dichas anterioridades no enseñan la invención de la presente solicitud, toda vez que estos términos son simplemente términos arbitrarios exentos de cualquier significad técnico. Sin ninguna descripción sobre las características técnicas únicas para la inserción MON15985, ninguno de los documentos **D1 a D4** suministran una enseñanza que se pueda reproducir por un experto en la técnica

y consecuentemente, estas referencias no pueden afectar el nivel inventivo de la presente solicitud.

A este respecto, repestuosamente ponemos de presente al señor examinador que de acuerdo con el Manual Andino de Patentes y la Doctrina solamente los eventos en los cuales se ha hecho una publicación completa de la invención (publicaciones o conferencias) que permitan a una persona llevarla a cabo tienen la capacidad de ser considerados como anterioridades válidas capaces de afectar la patentabilidad de la invención reivindicada. Lo anterior, por cuanto si dicha publicación no es completa o lo que es lo mismo, no revela toda la información relevante para llevarla a cabo, es claro que no corresponde ni a la misma invención reivindicada ni tiene las enseñanzas o sugerencias para llevarla a cabo.

Por su parte, **D5** describe el impacto de algodones que expresan una o dos endotoxinas de *B. thuringiensis* sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas del Lepidoptero. Aunque se menciona que el MON15985 es uno de los cultivares primarios utilizados en sus ensayos, **D5** no describe ninguna secuencia que sea diagnósticas para la inserción MON15985, es decir, no revela información sobre las secuencias de conexión de las SEQ ID NOs: 14-18 o de las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12. Es así como sin ninguna descripción sobre las características técnicas únicas para la inserción MON15985, dicho documento tampoco puede afectar el nivel inventivo de la presente solicitud.

D7 describe el método de expresar la Cry2A δ-endotoxina localizada en un organelo o compartimiento subcelular en plantas y plantas que comprenden una secuencia de polinucleótido que codifica una Cry2A δ-endotoxina. Aunque describir la coexpresión de Cry2Ab y otra δ-endotoxina Cry de *B. thuringiensis*, dicho documento no suministra ninguna enseñanza o ninguna motivación para la combinación exacta del Cry2Ab y el Cry1Ac sobre cualquier otros tipo de combinación, como la presente invención. Adicionalmente, el mismo, no enseña ninguna secuencia que sea diagnóstica para la inserción MON15985, es decir, no suministra ninguna descripción sobre las secuencias de

332
333

conexión de las SEQ ID NOs: 14-18 o de las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12. Por lo tanto, al no hacer mención ni sugerir las características técnicas únicas para la inserción MON15985, **D7** al igual que los documentos anteriores tampoco afecta el nivel inventivo de la presente solicitud, ya que no suministra enseñanzas que permitan a un técnico medio versado en el arte llevar a cabo la invención de mi representada.

Con respecto a la afirmación del señor Examinador con referencia a que el evento de inserción MON15985 representa una modificación que no es significativamente superior sobre el estado del arte, respetuosamente ponemos de presente que el estado del arte solo discute de manera general como coexpresar la δ-endotoxina Cry2A de *B. thuringiensis* con Dipteran inactivo y una δ-endotoxina Cry1 de *B. thuringiensis* y que tal coexpresión se espera logre propiedades insecticidas incrementadas en la planta transformada a través de la expresión incrementada y el desarrollo disminuido de la resistencia insecticida (*Ver*, Sección 2.6.3 de **D7**). Sin embargo, no existe enseñanza o sugerencia en **D7** de que la δ-endotoxina Cry2Ab y Cry1Ac deban ser específicamente combinadas sobre cualquier otros tipos de combinación de las δ-endotoxinas Cry2A y Cry1 para lograr un evento de inserción tal como se reivindica en la presente solicitud de patente.

existe la doble incidencia en 2A y Cry1A

Adicionalmente, las plantas de algodón MON15985 de la presente invención poseen propiedades inesperadas y superiores porque tales plantas suministran ventajas agronómicas a un cultivador, toda vez que el mismo consigue un mayor rendimiento de las plantas de algodón transformadas con genes de *B. thuringiensis* (es decir *cry2Ab* y *cry1Ac*) que son complementarias una a la otra. Tal evento de transformación da como resultado una (i) disminución en la probabilidad del desarrollo de una población de plagas de insectos que sean resistentes a la o las proteínas de cristal de *B. thuringiensis* (es decir insecticida), (ii) suministra un mecanismo interno para manejar a uno o a ambos de los insecticidas expresados en las plantas, y (iii) suministra medios para un acanalamiento limpio de las semillas en el comercio.

no posee las de los dos anteriores - Ni con D2

Por lo tanto, se puede concluir que ninguno de los documentos **D1 a D5 y D7** conducen a una persona versada en la materia a la solución de acuerdo con la presente solicitud de patente, toda vez que ninguno describe las secuencias de conexión de las SEQ ID NOs: 14-18 o de las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12, lo cual representa un avance en el estado del arte.

Finalmente, el Examinador sostiene que las reivindicaciones 12-15 no son inventivas a la luz de **D6**. A este respecto, respetuosamente aclaramos que **D6** describe un método PCR para detectar el ADN del fríjol de soya RoundUp Ready™ de una forma específica de línea, mas no enseña o sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que involucre las secuencias de conexión de la SEQ ID NOs: 14-18 o de las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12. En vista de la falta de información sobre las características técnicas específicas anteriormente mencionadas para la inserción MON15985, dicho documento, si bien suministra un método PCR para detectar una línea específica de un organismo genéticamente modificado (o GMO) no conducen a una persona versada en la materia a desarrollar un método para detectar el evento de inserción de algodón como se reivindica en la presente solicitud.

esto hace cualquier técnico versado en la materia.

Como se ha mencionado en repetidas ocasiones durante el texto, la presente invención está dirigida a la inserción MON15985 que se caracteriza por las secuencias de conexión de la SEQ ID NOs: 14-18 o por las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12, y es así como sin ningún conocimiento sobre las secuencias de conexión/amplicón características de la presente invención, un experto en el arte con las enseñanzas de **D6**, no estaría motivado a diseñar sondas/cebadores que sean específicos para la inserción MON15985. Adicionalmente, es importante aclarar que el hecho de saber emplear la técnica PCR, no es suficiente como motivación para detectar cualquier evento de inserción sin importar si los eventos son conocidos en la técnica o no.

En vista a lo anterior, **D6** no conduce a una persona versada en la materia a reproducir la presente invención tal como se reivindica, toda vez que dicho documento describe un

método PCR, mas no enseña o sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que involucre las secuencias de conexión de la SEQ ID NOs: 14-18 o de las secuencias amplicón de las SEQ ID NOs: 11 y 12.

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

5. **Anexos:**

5.1. Nuevo pliego reivindicatorio con 17 reivindicaciones;
5.2. Figura 1;
5.3. Formulario para modificaciones;
5.4. Recibo por valor de $99.000 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.

Bogotá,
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 12746 801 002 1
NNJ\NNJ\ID-103780\WPC12746
No. M-2007-103780\NNJ

335
336

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-F03

1 SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2 SOLICITANTE

Nombre: MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis,
Missouri 63167,
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio:
St. Louis,
Missouri,
Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución:
Estado de Delaware,
Estados Unidos de América.

Teléfono: 546 09 70 **Fax:** 547 31 70
E-mail: clientes@camyp.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 211 86 50

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 438.019 TP 31.929

4 Número de expediente: 02.049.630

5 Descripción de la corrección o modificación solicitada:
Se presenta la Figura 1 y un nuevo capítulo reivindicatorio con 17 reivindicaciones y con el objeto de subsanar la posible falta de claridad, unidad de invención y de nivel inventivo de la solicitud.

6 Comprobante de pago No. 07-48,992 **Fecha:** 20 de junio de 2007

7 Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa por $ 99.000
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8 NOMBRE: EMILIO FERRERO **FIRMA:** Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén **T.P.A.** 31.929

NNJ

337

Reivindicaciones

1. Una célula de planta de algodón resistente a insectos, derivada de una planta de algodón, en donde la semilla de dicha planta de algodón se ha depositado en el American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-2516.

2. Una célula de planta de algodón resistente a insecto, que comprende incorporada en el genoma de la célula de vegetal un Cry2Ab y ADN que codifica el inserto que tiene una secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO.14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO 16: SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18.

3. Una célula de planta de algodón resistente a insectos, que comprende incorporado en el genoma de célula vegetal ADN que codifica Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.

4. La célula de planta de algodón resistente a insecto de la reivindicación 2 o 3, que comprende además un casete de ADN que codifica Cry1Ac.

5. La célula de planta de algodón resistente a insectos de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la dicha célula de planta vegetal de algodón es homocigota para el inserto Cry2Ab.

6. La célula de planta de algodón resistente a insectos de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha célula de planta de algodón es heterocigota para el inserto Cry2Ab.

7. Un método para producir una planta de algodón resistente a insecto que comprende:

a) Cruzar una planta de algodón resistente a insecto, que comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y la SEQ ID NO: 18, con una planta de algodón diferente;

b) obtener al menos una planta de progenie derivada del cruce de (a); y

c) seleccionar la progenie que sea resistente a insectos y comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18.

8. Una molécula de ADN aislado, que comprende al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 o sus complementos, y traslapar al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18 o los complementos de esta.

9. La molécula de ADN aislado de la reivindicación 8 que comprende la SEQ ID NO: 11 o su complemento, o una porción de la SEQ ID NO: 11 o su complemento que traslapa al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; y SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 o los complementos de esta.

338
339

10. La molécula de ADN aislado de la reivindicación 8 que comprende la SEQ ID NO: 12 o su complemento, o una porción de la SEQ ID NO: 12 o su complemento que traslapa al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18 o los complementos de esta.

11. Una molécula de ADN aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que comprende la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

12. Un método para detectar la presencia de la inserción de MON15985 en un tejido de algodón que comprende:

a) seleccionar un par cebador que comprende cada uno al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 en donde cada miembro del par está a lados opuestos de un secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18;

b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con dicho par cebador;

c) desarrollar una amplificación de ADN y detectar un amplicón que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

339
340

13. El método de la reivindicación 12 en donde la etapa (c) comprende detectar un amplicón que comprende al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12.

14. El método de la reivindicación 12 o 13 en donde cada miembro de dicho par cebador se selecciona del grupo que consiste la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36.

15. Un método para detectar la presencia de la inserción MON15985 en tejido de algodón que comprende:

a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con una sonda de polinucleótido, en donde dicha sonda de polinucleótido hibridiza bajo condiciones de hibridización estrictas con una o más secuencias de ADN seleccionadas del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO. 18;

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

c) detectar la hibridización de la sonda en donde la presencia de la hibridización de dicha sonda es indicativa de la presencia de la inserción MON15985 en dicho tejido de algodón.

340
341

16. Un kit de detección de ADN que comprende una molécula de ADN aislado que comprende al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 o sus complementos, y traslapar al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18 o los complementos de esta.

17. El kit de detección de ADN de la reivindicación 16, en donde dicha molécula de ADN hibridiza bajo condiciones de hibridización estrictas con una o más secuencias de ADN seleccionadas de la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO. 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, y la SEQ ID NO: 18 o el o los complementos de esta.

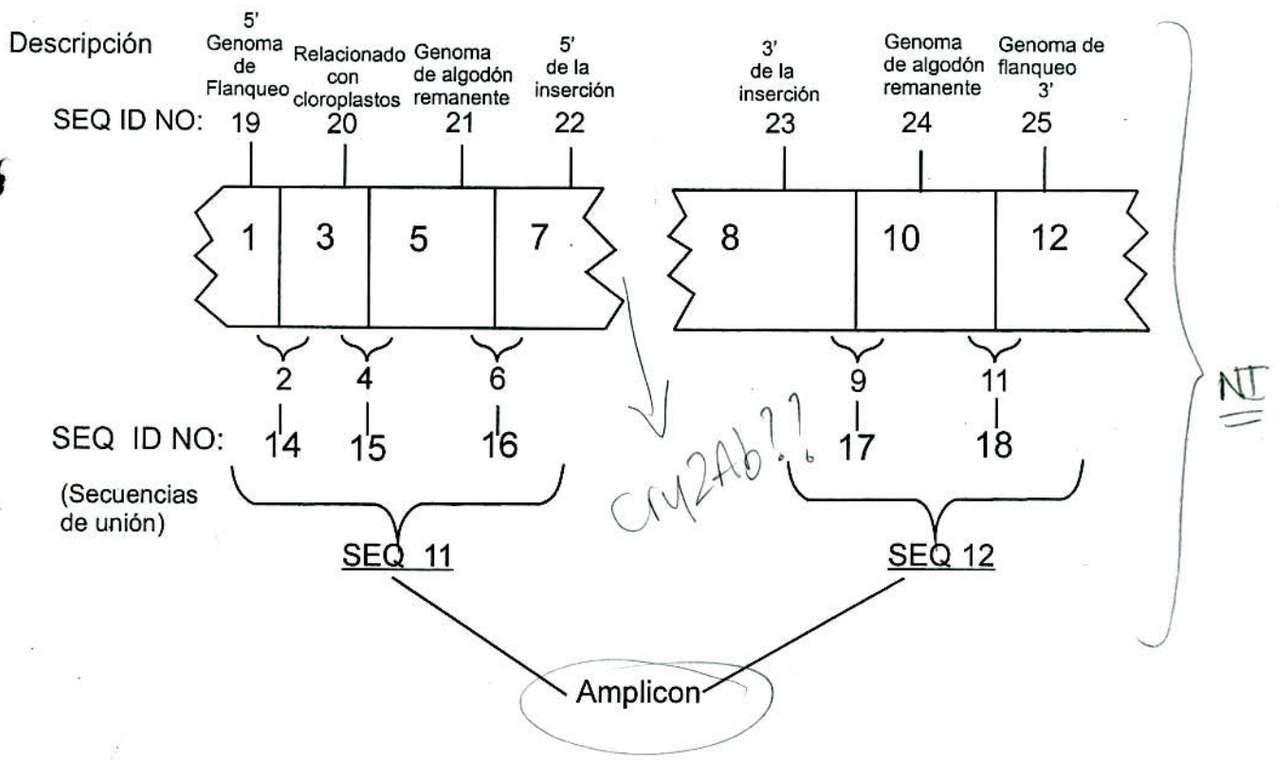


FIG. 1

SEQ. 11 = 14, 15, 16

SEQ. 12 = 17, 18.

342
343

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 48,992
FECHA : JUNIO 20 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55800363	19/06/2007	48,912,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL : $	99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO 12746 801 002 1

343

CASTELLANOS & Co.
Calle 94 A No.7ª-09
Bogotá-Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 02-049630- -00014-0000
Dep: 2020 NUECREACIONE
REGDEPOSITO
Folios: 7

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: Expediente No. **02.049.630**

Solicitud de Patente PCT entrada Fase Nacional para:

"PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE LOS MISMOS"

Solicitante: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

PRESENTACION DE DOCUMENTO DE PODER

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente me permito presentar documento de poder conferido por la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** que me habilita para continuar el trámite de la solicitud de patente de la referencia. Solicito, en consecuencia, se me reconozca personería y se me notifique toda actuación posterior a la presentación de este poder.

De la Señora Jefe,

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** de **C.S.J.**
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá, D.C.
Tel.: 610 7420 – 610 7480

Bogotá, D.C.,

Patentes/15/1529/MEMORIAL PRESENTACION DE PODER

345 344

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO,** mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO,** el poder que me confirió **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, con domicilio en **800 North Lindbergh Boulevard, St Louis, Missouri 67167, Estados Unidos de América,** debidamente legalizado por Apostilla bajo el No. **142500**, el día **21 de diciembre de 2005**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente en Colombia, para: **"PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DEL MISMO",** que se tramita bajo el Expediente No. **02049630.**

De la Señora Jefe,

Acepto

Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/zca/P1529

2

AUTENTICACIÓN DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:

Ximena Castellanos

identificado con C.C. 39773332

expedida en: Usaquén y tarjeta profesional de abogado(a) No. 58256 del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a S.I.C.

y declaró que la firma puesta en éste escrito es suya.

Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 17 OCT. 2007

AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
Carrera 12 Nº 93-26
AGUSTIN MORALES RIVEIRA

AUTENTICACIÓN DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:

Margarita Castellanos

identificado con C.C. 39779664

expedida en: Usaquén y tarjeta profesional de abogado(a) No. 70315 del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a S.I.C.

y declaró que la firma puesta en éste escrito es suya.

Firma del declarante

17 OCT. 2007

En Bogotá D.C. a

AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
Carrera 12 Nº 93-26
AGUSTIN MORALES RIVEIRA

COLOMBIA

6027-FNPC 345

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**

en **St. Louis, Missouri, USA**

por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19th December, 2005

in St. Louis, Missouri

by Dennis R. Hoerner

Dennis R. Hoerner

(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
16 OCT 2007
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

346
347

COLOMBIA

Hoy 19 de Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

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

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC
I certify:

a) That
Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public) Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin

NOTARY PUBLIC NOTARY SEAL STATE OF MISSOURI

MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogota D.C.
16 OCT 2007
ACUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

6027-FNPCT 349 348

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp

10. Signature:

Robin Carnahan

Comm. 48 (01-2005)

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
16 OCT 2007
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

5

----------TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig
3. actuando en su carácter de Notario Público
4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri
6. El día 21 de Diciembre de 2005

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
16 OCT 2007
AGUSTIN MC ALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO
OFIC. AUT.

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11: 5[illegible]

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

613662

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.

Bogotá, D.C.

16 OCT 2007

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Radicación No. 02-49630
Clasificación Internacional (IPC): A61K 38/20
Concepto Técnico No. 2055

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

1.1. Descripción: Folios: 2 a 10 como se radicó inicialmente

1.2. Reivindicaciones: 1 a 17 folios 337 a 341 radicada con la respuesta del 12 de julio de 2007.

1.3. Prioridad: Nº US60/297,406 de 11 de junio de 2001y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

2. Objeto de la invención

La presente solicitud se refiere a una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985 depositada como ATCC PTA-2516, y que comprende un inserto Cry2Ab y por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada a partir del grupo de SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o CryA2b más las secuencias SEQ ID No 11 y SEQ ID No 12.

También se reivindica el método para producir una planta de algodón resistente a herbicidas que comprende cruzar una planta resistente a herbicidas con una no resistente y seleccionar la progenie.

También hacen parte de la invención las secuencias de ADN aisladas que comprenden las SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18. Además se reivindican métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 en el tejido de algodón que comprende la selección de cebadores que hibridizan sobre secuencias que flanquean la secuencia de inserción MON15985 y la amplificación del segmento de interés. Por último se reclaman los kits de detección de ADN que comprenden las sondas que hibridizan con las secuencias SEC ID No 14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o que contienen los cebadores que hibridizan con las secuencias flanqueantes de MON 15985.

Según la IPC el anterior objeto se clasifica: A01H 01/06, C12N 5/00

3. Incumplimiento artículo 45 D.486

En el concepto técnico 321 en cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se requirió al solicitante para que diera respuesta a dicha comunicación indicando claramente que en caso de no dar

352
351

respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegaría la patente.

3.1 Incumplimiento *(artículo 30 D 486)*

En el concepto 321 se indicó expresamente: "La reivindicación 1 reclama una célula derivada de la planta PTA-2516. Sin embargo, como se mencionó en el concepto técnico previo, las plantas no son patentables a la luz de la D.486, por lo que una célula caracterizada por un elemento no patentable no estaría correctamente definida." A pesar de lo anterior, el solicitante sigue reclamando en la nueva clausula 1 la célula caracterizada por la planta no patentable incumpliendo los artículos 30 y 45 de la Decisión 486.

Adicionalmente en dicha oportunidad se indicó "En todo el capítulo reivindicatorio se emplean términos imprecisos como al menos o una fracción de..., que no limitan el alcance de la protección solicitada" Lo anterior teniendo en cuenta que el alcance de la protección esta delimitado por las revindicaciones, y al emplear términos imprecisos se reclama materia que resulta más amplia y especulativa, respecto de la verdaderamente divulgada. Dichos términos imprecisos impiden que una tercero pueda identificar con exactitud hasta donde llega la protección solicitada.

Sin embargo las cláusulas 8, 9, 10, y 16 actuales reclaman moléculas de ADN que "comprenden al menos" una porción de unas secuencia o que "traslapa al menos" una secuencia o un kit que contiene una molécula que comprende "al menos".., abarcando materia que va mas allá de la verdaderamente divulgada y que incluso puede existir de manera espontanea en la naturaleza. En cualquiera de los casos anteriores en los que no se limita la reclamación a una secuencia exacta, se reivindican un sinnúmero de moléculas que pueden no tener ninguna relación con el objeto de la presente invención. Así pues, que las clausulas mencionadas al mantener los defectos objetados previamente incumplen los requisitos estipulados en los artículos 30 y 45 de la D.486.

3.2 Unidad de invención *(artículo 25 D 486)*

En el concepto técnico 321 se indicó: "*Las reivindicaciones 2 a 3 reclaman una célula vegetal resistente a insecto que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12.*

El elemento común entre las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 es que todas ellas pueden acompañar al gen Cry2Ab en el inserto empleado para la transformación de las plantas de algodón. Sin embargo, este gen ya es bien conocido en la obtención de plantas transgénicas resistentes a insectos y por lo tanto no puede ser considerado como el elemento común inventivo que vincule a todos los insertos de ADN con los que se pueden transformar las células reivindicadas y en ese sentido las diferentes células caracterizadas mediante distintos insertos posibles no guardan unidad de invención entre ellas.

Por lo tanto, es importante resaltar que además de estar ligadas al gen de la endotoxina, las secuencias mencionadas arriba deberían presentar ***tanto una estructura común como una misma actividad****, para poder considerarlas como un único objeto de invención. En este sentido, sería estrictamente necesario que dicha* ***estructura común representara verdaderamente un salto cualitativo sobre la formulación de la regla técnica****. De lo contrario, no existiría una característica común nueva e inventiva que pudiese vincular a todas las posibles invenciones aquí reivindicadas, pero sobretodo ninguna de las combinaciones posibles Crya2b-SEQID No 14 a 17 sería patentable, por que no cumpliría con el requisito de nivel inventivo.*"

353
~~353~~
352

La actual reivindicación 11 reclama un ADN aislado que comprende la SEQ ID No14, No15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17 **ó** SEQ ID No 18.
El solicitante en su respuesta del 12 de julio de 2007 indica que las secuencias 14,15,16,17,18 son secuencias de conexión. Además indica: "las secuencias están todas físicamente ligadas, ya que la detección de cualquiera de estas secuencias que contiene ADN de algodón es diagnóstica de la presencia del evento MON 15985 y por lo tanto dichas secuencias se deben examinar en conjunto como una simple invención". Líneas abajo indica que las plantas de algodón MON 1585 presenta ventajas agronómicas para el cultivador.

Es importante aclararle al solicitante que las moléculas de ADN aisladas que flanquean el inserto característico de MON15985 no van a ser un único objeto si no constituyen una misma estructura. Además dicha estructura común debe ser nueva e inventiva. Es decir no puede ser conocida ni obvia. En este caso las secuencias arriba mencionadas no son las responsables de un efecto inesperado, por el contrario su función es más que esperada (que sirvan para el diagnóstico del inserto).

El hecho que puedan o NO estar ubicadas adyacentemente no las vuelve una única invención. Más aún cuando no existe evidencia de un efecto técnico sorprendente atribuido por dichas secuencias combinadas o individualmente. La ventaja agronómica es común a todas las plantas transformadas con BT(conocidas por décadas) y no es atribuida por las secuencias 14,15,16,17,18.

De esta forma se establece que la nueva clausula 11 incumple los requisitos de los artículos 25 y 45.

3.3. No es una invención *(artículo 15 D 486 literal a)-f))* (según causal)

La reivindicación 7 reclama el método de producción de una planta resitente a insectos que comprende las etapas de: a) el cruce de una planta resistente con una no resistente, b) contener al menos una planta derivada del cruce y c)seleccionar la progenie.

En el concepto técnico anterior se indicó claramente: "*el cruce entre plantas implica necesariamente la etapa de reproducción, que constituye indiscutiblemente un proceso esencialmente biológico,* ***independientemente si este se efectúa entre organismos modificados genéticamente o no****; de igual forma que las plantas y sus células se generan mediante procesos biológicos naturales en donde los resultados a obtener no son inesperados. De acuerdo con lo anterior se conceptúa que método reclamado al depender fundamentalmente de procedimientos esencialmente biológicos que pueden presentarse espontáneamente en la naturaleza sin la intervención del hombre, se encuentra dentro del alcance del artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones y por lo tanto no puede ser considerado como una invención.*"

El solicitante indica que el método anterior involucra la etapa de análisis de las plantas que tienen la inserción MON15985 que requiere la intervención humana.

Sin embargo cabe mencionar que en la presente solicitud no existe sustento para un método de diagnóstico "con intervención humana" indicando la secuencia lógica de etapas y las condiciones a las cuales se efectúa cada una de ellas, que lo pudiesen diferenciar de las técnicas de PCR o hibridización convencionales.

Por el contrario, la clausula 7 reclama expresamente un método **para producir una planta de algodón** resistente a insecto, donde la primera etapa (a) constituye

354
354
353

el cruce de una planta resistente con una no resistente. Dicha primera etapa es obligatoria, de lo contrario las siguientes no pueden llevarse a cabo, luego el elemento central del método reivindicado es justamente dicha etapa que abarca procesos biológicos naturales que dependen exclusivamente de la naturaleza y es por esto que la materia reivindicada en la clausula en mención no constituye una invención de acuerdo con el artículo 15 e incumple con el artículo 45.

4. Determinación del Estado de la Técnica

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 11 de junio de 2001, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	Evaluation of BollgardII (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field eficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab"	JAN. 9-13, 2001,
2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	Field efficacy of cotton expressing tow insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis"	JAN. 9-13, 2001,
3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	"Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas"	JAN. 9-13, 2001
4	ACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 815-819	Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm , Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhous studies"	JAN. 9-13, 2001
5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, no. 3, pages 752-760	"Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" (2001-06), ,	June 2001
6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	: "Development Of A Line Specific GMO Detection Method A Case Study"	1999-09-22

355
355
354

7	WO0026371	Methods For Transforming Plants To Express Bacillus Thuringiensis Delta-Endotoxins.	11/05/2000

5. Análisis de patentabilidad (según requisito) (artículo 14 D486)

5.3. Nivel inventivo *(artículo18 D486)*

Las reivindicaciones 1 a 3 y dependientes reclaman una célula vegetal derivada de una planta resistente a insectos (PTA 2526 - evento MON 15985) caracterizada en que comprende un inserto del gen CryA2b acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 para la generación de plantas de algodón resistentes a insectos incluidas las células de plantas transformadas con genes codificantes para proteínas con actividad insecticida.

Los documentos D1 a D5 divulgan el evento MON15985, elemento central de la presente invención, bajo diferentes nombres (DP50BII, Bolgard II, DPL15985, DP50Bx) que corresponden específicamente a plantas transgenicas de algodón resistentes a insectos que expresan las endotoxinas de Bacillus thuringiensis. En esos mismos documentos se enseña que dichas plantas pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. D7 resalta la combinación de las dos endotoxinas en un mismo OGM.

La presente solicitud difiere de las anterioridades en que el gen CryA2b está acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18. Sin embargo, de la lectura de toda la solicitud no existe un solo ensayo que demuestre que éstas secuencias le atribuyen al inserto una ventaja técnica respecto de los eventos divulgados en las anterioridades D1 a D5.

El solicitante indica en la respuesta de julio del 2007 que : "las plantas de algodón MON15985 suministras ventajas agronómicas a un cultivador". Sin embargo las plantas de las anterioridades D1 a D5, también son MON1585 y también suministran ventajas agronómicas al cultivador. Así pues que así el solicitante insista en lo contrario, el elemento diferencial entre la presente invención y las divulgadas en el estado de la técnica (Secuencias 14 a 18), no representa un aporte significativo al estado de la técnica, pues no existe evidencia acerca de un efecto técnico atribuido justa y exclusivamente a las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18.

Por otra parte la reivindicación 4 reclama la célula de planta resistente a insectos de la reivindicación 2 que además comprende un cassette codificante para CryAc1. Entonces, el problema a resolver con la presente solicitud sería generar plantas de algodón alternativas que comprendan los genes CryAb y CryAc para conferir resistencia a insectos.

En el documento D5 se enseña que las plantas de algodón MON 1585 pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. El documento D7 describe el método de expresar la Cry2A delta endotoxina en plantas y describe la co-expresión de CryA2b con otra endotoxina.

356
356
355

Ahora bien, considerando que la introducción de más de una proteína insecticida en un mismo evento de algodón transgénico ya había sido sugerida por D5, y que en la presente solicitud no existe evidencia de un efecto técnico ventajoso respecto a los eventos de algodón transgénico divulgados en las anterioridades, se conceptúa el evento de inserción reivindicado en las clausulas 4 a 6 representa una modificación que no es significativamente superior al estado del arte, que es producto de una selección arbitraria de una inserción aleatoria, a la cual hubiera podido llegar cualquier persona versada en la materia sin ninguna actividad inventiva (la posición de la inserción no fue planeada con el objeto de obtener resultados inesperados).

Las reivindicaciones 12 a 15 reclaman métodos para detectar la inserción de MON15985, que consisten en la amplificación simple de determinados segmentos del genoma empleando cebadores seleccionados y examinando el amplicón obtenido; así como métodos que emplean el principio de hibridización para detectar ciertas regiones del genoma complementarios a ciertas sondas escogidas.

El documento D6 divulga un procedimiento basado en PCR empleando primers contra las secuencias que flanquean el inserto.

En la presente solicitud seleccionaron primes arbitrariamente para identificar secuencias flanqueantes del inserto de interés, denominadas de diagnóstico, las cuales son útiles para el diseño de sondas que permiten la identificación del evento por hibridización.

Basados en el hecho que cualquier persona versada en técnicas de biología molecular conoce muy bien el concepto de emplear PCR para determinar la secuencias de regiones de interés así como los principios de hibridización y diseño de sondas, resulta que los procedimientos empleados por el solicitante para la detección de un inserto determinado se derivan evidentemente del estado de la técnica.

Es decir, a pesar que se efectué una selección de determinados cebadores o sondas, el método no va a diferir de los empleados constantemente en los ensayos de caracterización molecular, pues cualquier técnico versado en la materia, como actividad de rutina selecciona primers y sondas que puedan hibridizar son sus secuencias target. De esta forma, los métodos reclamados más bien representan el uso de las sondas y cebadores seleccionados en métodos corrientes, pero que no le atribuyen ninguna ventaja técnica sobre los que ya existen en el estado de la técnica. Los kits (reiv 16 a 17) caracterizados por contener un ADN que hibridiza con las secuencias flanquenates tampoco exhiben altura inventiva alguna

Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

357
356

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	1 a 6,	Nivel Inventivo
2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	1 a 6,	Nivel Inventivo
3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	1 a 6	Nivel Inventivo
4	ACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 815-819	1 a 6	Nivel Inventivo
5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, no. 3, pages 752-760	1 a 6	Nivel Inventivo
6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	12 a 17	Nivel Inventivo
7	WO0026371	1 a 6	Nivel Inventivo

6. Respuesta a los argumentos del solicitante:

El solicitante indica que las anterioridades no afectan el nivel inventivo de la presente invención porque:

6.1 Solo los documentos en los cuales se ha hecho una publicación completa de la invención que permitan a una persona llevarla a cabo tienen la capacidad de ser consideradas como anterioridades validas capaces de afectar la patentabilidad.

A este respecto es imperativo aclarar la confusión que presenta el señor memorialista. Cuando una anterioridad divulga "completamente la invención" se trata de un "plagio". Por otra parte, si de un solo documento se extraen todos los elementos característicos de la invención entonces se trata de una falta de novedad.

Ahora bien, en la presente solicitud, la objeción fue efectuada por NIVEL INVENTIVO y para este caso las anterioridades solo deben divulgar elementos que combinados con los conocimientos de una persona medianamente versada en la materia permiten llegar sin ningún esfuerzo a la invención reclamada. Así pues, que al encontrarse en los documentos D1 a D7, de manera independiente, la materia que sirvió de partida para que un técnico medianamente versada en la materia haciendo uso de sus propios conocimientos llegara a encontrar

358
~~352~~ 351

secuencias diagnósticas para la detección de un determinado inserto, dichos documentos son totalmente relevantes para la afectación de nivel inventivo..

6.2. No se revelan específicamente secuencias que sean diagnósticas para la inserción de MON1585.

No era necesario que se divulgaran las secuencias diagnósticas, puesto que la forma en la que éstas fueron determinadas por el solicitante, es bien conocida por cualquier técnico versado en la materia quien puede llegar a ellas sin ninguna dificultad. Los procedimientos empleados constituyen métodos de primera elección para cualquier técnico del campo tecnológico al cual pertenece la invención.

6.3 En D7 no suministra ninguna enseñanza o motivación para la "combinación exacta" Cry2Ab y Cry1Ac.

El documento D7 no era la única anterioridad donde se sugería la combinación de proteínas insecticidas en eventos de algodón transgénico, pues D5 también lo divulgo. Como ya se ha mencionado anteriormente no es necesario que se divulgue completamente la invención para que un experto en la materia se vea motivado a efectuar combinaciones de diferentes proteínas Bt y luego observar que sucedía. Pero además lo más importante es que en la presente solicitud no existe evidencia de una ventaja técnica para dicha "combinación exacta" que no sea común a los demás eventos MON 1585 divulgados en las anterioridades.

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Negar** las reivindicaciones: 1 a 17 (folios:337 a 341).

Bogotá, D.C.,26 de octubre de 2007.

CONCEPTO TECNICO No. 2055	**EXAMINADOR TECNICO** 202063

/103

AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

358

Radicación :	**2-49630- -16-0 Fecha: 2007-12-17 08:20:32**
Trámite :	**2 PATENTES**
Evento :	**1 REGDEPOSITO**
Actuación :	**432 COMUNICACTOADM**
Destinatario :	**MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO Folios 1**

Señor (a) (es)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
CALLE 94 A NO. 7 A-09
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 41832
Fecha : 13/12/2007
Expediente : 2-49630
Trámite : 2 PATENTES DE INVENCION
Evento : 1 REGISTRO/DEPOSITO/CONCESION/DEPOSITO
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comedidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea - caracter general - consulta actos administrativos.

Secretaría General
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

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

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Cra 50 No. 26-55 Int 2 PBX: 3820840
Fax: 3 82 26 95 3 50 52 20. Línea 018000 910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

LA SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO (E)
en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 4, numeral 5 del decreto 2153 de 1992, y

CONSIDERANDO

PRIMERO: Que mediante escrito radicado en esta Superintendencia el 11 de junio de 2002, bajo el número 02049630, se presentó la solicitud de patente de invención titulada "PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO".

SEGUNDO: Que efectuado el examen de forma en cuanto a los requisitos que debe llenar la solicitud y cumplidas las exigencias legales, se ordenó publicar el extracto sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.

TERCERO: Que realizado el examen de patentabilidad se encontró que la invención no es patentable. En consecuencia, con fundamento en lo dispuesto en los artículos 45 y 46 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se requirió al peticionario en dos oportunidades para que se pronunciara sobre las objeciones efectuadas a la solicitud.

CUARTO: Que mediante escritos radicados el 4 de octubre de 2006, 1 de febrero y 12 de julio de 2007, el solicitante atendió oportunamente los requerimientos formulados y presentó aclaraciones. Así mismo, allegó un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual se ajusta a las prescripciones del artículo 34 de la Decisión 486.

QUINTO: Que según lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina se otorgarán patentes "...para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

SEXTO: Que las nuevas reivindicaciones 1 a 6 y 12 a 17, contenidas en los folios 337 a 341, no cumplen con el requisito de nivel inventivo, la nueva reivindicación 7 relaciona materia que no se considera una invención, las nuevas reivindicaciones 8, 9, 10 y 16 no definen la materia para la cual solicitan invención y la nueva reivindicación 11 no guarda unidad de una invención. Lo anterior, de acuerdo con las siguientes consideraciones:

1. Objeto de la invención

La invención propone una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985 depositada como ATCC PTA-2516, y que comprende un

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

inserto Cry2Ab y por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada a partir del grupo de SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o CryA2b más las secuencias SEQ ID No 11 y SEQ ID No 12.

También se reivindica el método para producir una planta de algodón resistente a herbicidas, que comprende cruzar una planta resistente a herbicidas con una no resistente y seleccionar la progenie.

También hacen parte de la invención las secuencias de ADN aisladas que comprenden las SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18. Además, se reivindican métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 en el tejido de algodón que comprende la selección de cebadores que hibridizan sobre secuencias que flanquean la secuencia de inserción MON15985 y la amplificación del segmento de interés.

También, se reclaman los kits de detección de ADN que comprenden las sondas que hibridizan con las secuencias SEC ID No 14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o que contienen los cebadores que hibridizan con las secuencias flanqueantes de MON 15985.

2. No se considera invención

El artículo 15.b) de la Decisión 486, señala que no se considerarán invenciones "el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural".

La reivindicación 7 reclama el método de producción de una planta resistente a insectos que comprende las etapas de: a) el cruce de una planta resistente con una no resistente, b) contener al menos una planta derivada del cruce y c) seleccionar la progenie.

En el oficio trasladado, se indicó claramente: "...el cruce entre plantas implica necesariamente la etapa de reproducción, que constituye indiscutiblemente un proceso esencialmente biológico, independientemente si este se efectúa entre organismos modificados genéticamente o no; de igual forma que las plantas y sus células se generan mediante procesos biológicos naturales en donde los resultados a obtener no son inesperados. De acuerdo con lo anterior se conceptúa que método reclamado al depender fundamentalmente de procedimientos esencialmente biológicos que pueden presentarse espontáneamente en la naturaleza sin la intervención del hombre, se encuentra dentro del alcance del artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones y por lo tanto no puede ser considerado como una invención."

El solicitante indica que el método anterior involucra la etapa de análisis de las plantas que tienen la inserción MON15985, que requiere la intervención humana.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

Sin embargo, cabe mencionar que en la presente solicitud no existe sustento para un método de diagnóstico "con intervención humana" indicando la secuencia lógica de etapas y las condiciones a las cuales se efectúa cada una de ellas, que lo pudiesen diferenciar de las técnicas de PCR o hibridización convencionales.

Por el contrario, la reivindicación 7 reclama expresamente un método para producir una planta de algodón resistente a insecto, donde la primera etapa (a) constituye el cruce de una planta resistente con una no resistente. Dicha primera etapa es obligatoria, de lo contrario las siguientes no pueden llevarse a cabo, luego el elemento central del método reivindicado es justamente dicha etapa que abarca procesos biológicos naturales que dependen exclusivamente de la naturaleza y es por esto que la materia reivindicada en la reivindicación en mención no constituye una invención.

Por las anteriores razones, se considera que la reivindicación 7, a pesar de la objeción oportunamente formulada, se encuentra incursa en lo dispuesto por el artículo 15.b) de la norma supranacional andina.

3. Sobre las reivindicaciones

El artículo 30 de la citada Decisión 486 establece que "las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción".

En el Oficio N° 2757, notificado al solicitante el 1 de marzo de 2007, se indicó expresamente: "La reivindicación 1 reclama una célula derivada de la planta PTA-2516. Sin embargo, como se mencionó en el concepto técnico previo, las plantas no son patentables a la luz de la D.486, por lo que una célula caracterizada por un elemento no patentable no estaría correctamente definida".

Sin embargo, el solicitante en el nuevo capítulo reivindicatorio sigue reclamando la célula caracterizada por la planta no patentable, incumpliendo lo dispuesto por el mencionado artículo 30 de la normativa andina.

Adicionalmente, en dicha oportunidad se indicó: "En todo el capítulo reivindicatorio se emplean términos imprecisos como al menos o una fracción de..., que no limitan el alcance de la protección solicitada". La anterior objeción, se efectuó teniendo en cuenta que el alcance de la protección esta delimitado por las reivindicaciones, de tal manera que al emplear términos imprecisos, finalmente se reclama materia que resulta más amplia y especulativa, respecto de la verdaderamente divulgada. Dichos términos imprecisos impiden que un tercero pueda identificar con exactitud hasta donde llega la protección solicitada.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

Sin embargo, las nuevas reivindicaciones 8, 9, 10 y 16 reclaman moléculas de ADN que 'comprenden al menos' una porción de unas secuencia o que 'traslapa al menos' una secuencia o un kit que contiene una molécula que comprende 'al menos', abarcando materia que va mas allá de la verdaderamente divulgada y que incluso puede existir de manera espontánea en la naturaleza.

En cualquiera de estos casos en los que no se limita la reclamación a una secuencia exacta, se reivindican un sinnúmero de moléculas que pueden no tener ninguna relación con el objeto de la presente invención, manteniendo los defectos objetados previamente y no permitiendo por ende un estudio del estado de la técnica respecto del las reivindicaciones citadas.

Dado lo anterior, se advierte que las mencionadas reivindicaciones *aún* no cumplen con las prescripciones señaladas en el artículo 30 de la norma supranacional andina.

4. Evaluación de la unidad de invención

El artículo 25 de la Decisión 486 establece que "La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo".

En el mencionado Oficio N° 2757, se indicó que: "Las reivindicaciones 2 a 3 reclaman una célula vegetal resistente a insecto que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12.

"El elemento común entre las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 es que todas ellas pueden acompañar al gen Cry2Ab en el inserto empleado para la transformación de las plantas de algodón. Sin embargo, este gen ya es bien conocido en la obtención de plantas transgénicas resistentes a insectos y por lo tanto no puede ser considerado como el elemento común inventivo que vincule a todos los insertos de ADN con los que se pueden transformar las células reivindicadas y en ese sentido las diferentes células caracterizadas mediante distintos insertos posibles no guardan unidad de invención entre ellas.

"Por lo tanto, es importante resaltar que además de estar ligadas al gen de la endotoxina, las secuencias mencionadas arriba deberían presentar tanto una estructura común como una misma actividad, para poder considerarlas como un único objeto de invención. En este sentido, sería estrictamente necesario que dicha estructura común representara verdaderamente un salto cualitativo sobre la formulación de la regla técnica. De lo contrario, no existiría una característica común nueva e inventiva que pudiese vincular a todas las posibles invenciones aquí reivindicadas, pero sobretodo ninguna de las

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

combinaciones posibles Crya2b-SEQID No 14 a 17 sería patentable, por que (sic) no cumpliría con el requisito de nivel inventivo" (subrayados del texto).

La nueva reivindicación 11, reclama un ADN aislado que comprende la SEQ ID No14, No15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17 **ó** SEQ ID No 18. Por su parte, el solicitante en su respuesta del 12 de julio de 2007, indica que las secuencias 14,15,16,17,18 son secuencias de conexión. Además indica: "las secuencias están todas físicamente ligadas, ya que la detección de cualquiera de estas secuencias que contiene ADN de algodón es diagnóstica de la presencia del evento MON 15985 y por lo tanto dichas secuencias se deben examinar en conjunto como una simple invención". Líneas abajo indica que las plantas de algodón MON 1585 presenta ventajas agronómicas para el cultivador.

Es importante aclararle al solicitante, que las moléculas de ADN aisladas que flanquean el inserto característico de MON15985, no van a ser un único objeto si no constituyen una misma estructura. Además, dicha estructura común debe ser nueva e inventiva. Es decir, no puede ser conocida ni obvia. En este caso las secuencias arriba mencionadas no son las responsables de un efecto inesperado, por el contrario su función es más que esperada (que sirvan para el diagnóstico del inserto).

El hecho que puedan o no estar ubicadas adyacentemente no las vuelve una única invención, más aún cuando no existe evidencia de un efecto técnico sorprendente atribuido por dichas secuencias combinadas o individualmente. La ventaja agronómica es común a todas las plantas transformadas con BT(conocidas por décadas) y no es atribuida por las secuencias 14,15,16,17,18.

De esta forma se establece, que a pesar de advertirle al solicitante sobre la falta de unidad de invención, la nueva reivindicación 11 aún no cumple lo dispuesto en el mencionado artículo 25 de la norma supranacional andina.

5. Determinación del estado de la técnica

5.1 Fecha determinante para el análisis comparativo

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 11 de junio de 2001, que corresponde a la fecha de la prioridad invocada respecto de la solicitud Nº US60/297,406. La prioridad fue tenida en cuenta para el estudio de patentabilidad, según obra en el folio 351 del expediente en estudio.

5.2 Documentos del estado de la técnica

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta se encontraron los siguientes documentos, anteriores a la fecha de la prioridad invocada y relacionados con la materia

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pags. 835-837	Evaluation of BollgardII (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field eficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab"	Enero 9-13, 2001,
2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, páginas 1041-1043	Field efficacy of cotton expressing tow insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis"	Enero. 9-13, 2001,
3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 páginas 833-835.	"Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas"	Enero. 9-13, 2001
4	ACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 páginas 815-819	Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm , Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhous studies"	Enero. 9-13, 2001
5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, no. 3, páginas 752-760	"Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" (2001-06), ,	Junio 2001
6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. páginas 459-462.	: "Development Of A Line Specific GMO Detection Method A Case Study"	22/09/1999
7	WO0026371	Methods For Transforming Plants To Express Bacillus Thuringiensis Delta-Endotoxins.	11/05/2000

6. Nivel inventivo

Según lo dispuesto en el artículo 18 de la misma Decisión 486, "se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El estado de la técnica, al tenor de lo dispuesto en el artículo 16 de la misma Decisión, comprende "todo lo que haya sido accesible al público, por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida".

El Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina recientemente ha dicho sobre este requisito, lo siguiente:

"El artículo 4 de la Decisión 344 desarrolla el requisito de nivel inventivo al establecer que la invención goza de dicho nivel al no derivar de manera evidente del estado de la técnica, ni que hubiese resultado obvia para una persona entendida o versada en la materia. Este requisito ofrece al examinador la posibilidad de determinar si con los conocimientos técnicos que existían al momento de la invención, se hubiese podido llegar de manera evidente a la misma, o si el resultado hubiese sido obvio para un experto medio en la materia de que se trate, es decir, para una persona del oficio y normalmente versada en la materia técnica correspondiente.

"Con respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha manifestado lo siguiente:

> *'Con el requisito del nivel inventivo, lo que se pretende es dotar al examinador técnico e un elemento que le permita afirmar o no si a la invención objeto de estudio no se habría podido llegar a partir de los conocimientos técnicos que existían en ese momento dentro del estado de la técnica... En este punto conviene advertir que uno es el examen que realiza el técnico medio respecto de la novedad y otro el que se efectúa con respecto al nivel inventivo; si bien en uno y otro se utiliza como parámetro de referencia el 'estado de la técnica', en el primero, se coteja la invención con las 'anterioridades' existentes dentro de aquella, cada uno (sic) por separado, mientras que en el segundo (nivel inventivo) se exige que el técnico medio que realiza el examen debe partir del conocimiento general que él tiene sobre el estado de la técnica y realizar el cotejo comparativo con su apreciación de conjunto, determinando si con tales conocimientos técnicos existentes ha podido o no producirse tal invención'*

"Ahora bien, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344 resulta pertinente definir que se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de, consecuencialmente, determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

"Lo obvio es *"aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo que se encuentra o pone delante de los ojos o que no tiene dificultad"*. Mientras que lo evidente *"es algo tan cierto y claro que nadie puede dudar racionalmente de ello; se presenta de manera tan perceptible y manifiesta que muestra certeza y claridad'*[7]. Como se podrá ver, la diferencia radica en lo "tan", de forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

"En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado".[1]

Visto lo anterior, se advierte que la solicitud no cumple el requisito de nivel inventivo, toda vez que a los ojos de un experto medio, y de conformidad con el estado de la técnica que existía en ese momento, es una consecuencia clara y directa de dicho estado.

En efecto, las reivindicaciones 1 a 3 y dependientes reclaman una célula vegetal derivada de una planta resistente a insectos (PTA 2526 - evento MON 15985), caracterizada porque comprende un inserto del gen CryA2b acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 para la generación de plantas de algodón resistentes a insectos, incluidas las células de plantas transformadas con genes codificantes para proteínas con actividad insecticida.

Los documentos D1 a D5 divulgan el evento MON15985, elemento central de la presente invención, bajo diferentes nombres (DP50BII, Bolgard II, DPL15985, DP50Bx), que corresponden específicamente a plantas transgenicas de algodón resistentes a insectos que expresan las endotoxinas de Bacillus thuringiensis. En esos mismos documentos se enseña que dichas plantas pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. D7 resalta la combinación de las dos endotoxinas en un mismo OGM.

La presente solicitud difiere de las anterioridades, en que el gen CryA2b está acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18. Sin embargo, de la lectura de toda la solicitud no existe un solo ensayo que demuestre que éstas secuencias le atribuyen al inserto una ventaja técnica respecto de los eventos divulgados en las anterioridades D1 a D5.

El solicitante indica en su respuesta radicada el 12 de julio del 2007, que: "las plantas de algodón MON15985 suministra ventajas agronómicas a un cultivador". Sin embargo las plantas de las anterioridades D1 a D5, también son MON1585 y también suministran ventajas agronómicas al cultivador. Así pues, y así el solicitante insista en lo contrario, el elemento diferencial entre la presente invención y las divulgadas en el estado de la técnica (secuencias 14 a 18), no representa un aporte significativo al estado de la técnica, pues no existe evidencia acerca de un efecto técnico atribuido justa y exclusivamente a las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18.

Por otra parte, la reivindicación 4 reclama la célula de planta resistente a insectos de la reivindicación 2, que además comprende un casete codificante para CryAc1. Entonces, el problema a resolver con la presente solicitud sería generar plantas de algodón alternativas que comprendan los genes CryAb y CryAc para conferir resistencia a insectos.

---

[1] PROCESO 88-IP-2005, sentencia de interpretación prejudicial del 27 de julio del 2005.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

En el documento D5 se enseña que las plantas de algodón MON 1585, pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. Por su parte, el documento D7 describe el método de expresar la Cry2A delta endotoxina en plantas y describe la coexpresión de CryA2b con otra endotoxina.

Ahora bien, considerando que la introducción de más de una proteína insecticida en un mismo evento de algodón transgénico ya había sido sugerida por D5, y que en la presente solicitud no existe evidencia de un efecto técnico ventajoso respecto a los eventos de algodón transgénico divulgados en las anterioridades, se considera que el evento de inserción reivindicado en las clausulas 4 a 6 representa una modificación que no es significativamente superior al estado del arte, que es producto de una selección arbitraria de una inserción aleatoria, a la cual hubiera podido llegar cualquier persona versada en la materia sin ninguna actividad inventiva (la posición de la inserción no fue planeada con el objeto de obtener resultados inesperados).

Las reivindicaciones 12 a 15 reclaman métodos para detectar la inserción de MON15985, que consisten en la amplificación simple de determinados segmentos del genoma empleando cebadores seleccionados y examinando el amplicón obtenido; así como métodos que emplean el principio de hibridización para detectar ciertas regiones del genoma complementarios a ciertas sondas escogidas.

El documento D6 divulga un procedimiento basado en PCR empleando primers contra las secuencias que flanquean el inserto.

En la presente solicitud seleccionaron primers arbitrariamente para identificar secuencias flanqueantes del inserto de interés, denominadas de diagnóstico, las cuales son útiles para el diseño de sondas que permiten la identificación del evento por hibridización.

Basados en el hecho que cualquier persona versada en técnicas de biología molecular, conoce muy bien el concepto de emplear PCR para determinar la secuencias de regiones de interés así como los principios de hibridización y diseño de sondas, resulta que los procedimientos empleados por el solicitante para la detección de un inserto determinado se derivan evidentemente del estado de la técnica.

Es decir, a pesar que se efectué una selección de determinados cebadores o sondas, el método no va a diferir de los empleados constantemente en los ensayos de caracterización molecular, pues cualquier técnico versado en la materia, como actividad de rutina selecciona primers y sondas que puedan hibridizar son sus secuencias target. De esta forma, los métodos reclamados más bien representan el uso de las sondas y cebadores seleccionados en métodos corrientes, pero que no le atribuyen ninguna ventaja técnica sobre los que ya existen en el estado de la técnica. Los kits (reivindicaciones 16 a

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

17) caracterizados por contener un ADN que hibridiza con las secuencias flanquenates tampoco exhiben altura inventiva alguna.

Como se observa, el objeto de las reivindicaciones 1 a 6 y 12 a 17 de esta solicitud, resulta obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivado de manera evidente del estado de la técnica, razón por la cual carece del requisito de nivel inventivo definido en el artículo 18 de la norma supranacional andina y, por ello, no accede al privilegio solicitado.

En conclusión, la presente solicitud se encuentran afectada de la siguinte manera:

Documento Nº	Reivindicaciones	Requisito que afecta
1	1 a 6	Nivel Inventivo
2	1 a 6	Nivel Inventivo
3	1 a 6	Nivel Inventivo
4	1 a 6	Nivel Inventivo
5	1 a 6	Nivel Inventivo
6	12 a 17	Nivel Inventivo
7	1 a 6	Nivel Inventivo

7. Respuesta del solicitante

Sobre los comentarios del solicitante a la notificación de fondo, conviene realizar las siguientes consideraciones:

- El solicitante indica que las anterioridades no afectan el nivel inventivo de la presente invención porque solo los documentos en los cuales se ha hecho una publicación completa de la invención, que permitan a una persona llevarla a cabo, tienen la capacidad de ser consideradas como anterioridades validas capaces de afectar la patentabilidad.

  A este respecto, es imperativo señalar que no se puede caer en el error de confundir los requerimientos de la novedad con los requerimientos del nivel inventivo, como sucede en la respuesta del interesado. Para objetar la novedad se exige que todas las enseñanzas reclamadas en una misma invención se encuentren en un mismo documento, mientras que, para objetar el nivel inventivo, no es así, las características que no se encuentran en el documento de una referencia se pueden encontrar en otros documentos o hacen parte del conocimiento general que tiene el experto medio sobre el estado de la técnica. Es la combinación resultante la que nos sirve para objetar el nivel inventivo de las reivindicaciones.

  En la presente caso, la solicitud fue objetad por falta de nivel inventivo, razón por la

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

cual es la combinación resultante la que le permite a una persona medianamente versada en la materia llegar sin ningún esfuerzo a la invención reclamada. Así pues, que al encontrarse, de manera independiente, en los documentos D1 a D7 la materia que sirvió de partida para que un técnico medianamente versada en la materia, haciendo uso de sus propios conocimientos, llegara a encontrar secuencias diagnósticas para la detección de un determinado inserto, dichos documentos son totalmente relevantes para la afectación de nivel inventivo.

- Dice el interesado que no se revelan específicamente secuencias que sean diagnósticas para la inserción de MON1585.

  Sin embargo, no era necesario que se divulgaran las secuencias diagnósticas, puesto que la forma en la que éstas fueron determinadas por el solicitante es bien conocida por cualquier técnico versado en la materia, quien puede llegar a ellas sin ninguna dificultad. Los procedimientos empleados constituyen métodos de primera elección para cualquier técnico del campo tecnológico al cual pertenece la primera invención.

- Afirma el solicitante que D7 no suministra ninguna enseñanza o motivación para la "combinación exacta" Cry2Ab y Cry1Ac.

  Al respecto, se anota que el documento D7 no era la única anterioridad donde se sugería la combinación de proteínas insecticidas en eventos de algodón transgénico, pues D5 también lo divulgó. Y, como ya se ha mencionado anteriormente no es necesario que se divulgue completamente la invención para que un experto en la materia se vea motivado a efectuar combinaciones de diferentes proteínas Bt y luego observar que sucedía. Además, en la presente solicitud no existe evidencia de una ventaja técnica para dicha "combinación exacta" que no sea común a los demás eventos MON 1585 divulgados en las anterioridades.

En vista de lo expuesto, y teniendo en cuenta que los comentarios y correcciones allegados no controvierten ni subsanan en forma alguna las objeciones planteadas en los oficios trasladados, se ratifica que la solicitud no puede acceder al privilegio de patente solicitado.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Negar el privilegio de patente de invención a la creación denominada: "PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCIÓN DEL MISMO".

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 41832
Por la cual se niega una patente de invención

Rad. Nº 02049630

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente a la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada de la sociedad Monsanto Technology LLC., o a quien haga sus veces, el contenido de la presente resolución, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición ante el Superintendente de Industria y Comercio al momento de notificarse o dentro de los 5 días hábiles siguientes.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dada en Bogotá D.C., a los 13 DIC. 2007

LA SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO (E),

MARIA TERESA PINEDA BUENAVENTURA

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Calle 94 A N° 7A – 09
Bogotá D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
EL SECRETARIO GENERAL
Certifica que la resolución 41832 de fecha 13/12/2007
fué notificado mediante listado número 38
fijado el 26/12/2007 y desfijado el 10/01/2008

391

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCI(
Superintendencia de Industria y Comercio
Ministerio de Desarrollo Económico
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 02-049630 -00017-0000
Dep: 2020 NUECREACIONE
REGDEPOSITO
Folios: 12

RECURSO DE REPOSICION

Ref.: Expediente No. **02.049.630**
Solicitud de Patente de Invención para:
"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO"
Solicitante: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, domiciliada e identificada como aparece al pié de mi firma, apoderada de la sociedad solicitante en el asunto de la referencia, atentamente acudo a su Despacho con el fin de interponer **RECURSO DE REPOSICIÓN** (art. 50 C.C.A.) para que se revoque en su totalidad la resolución No. **41832** de 13 de diciembre de 2007, notificada por edicto desfijado el 10 de enero de 2008.

1. LA RESOLUCION No. 41832

La Superintendencia de Industria y Comercio expidió la Resolución No. 41832 por la cual se niega la patente que fue solicitada el día 11 de junio de 2002, para el invento denominado: "**PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO",** y radicada bajo el expediente Nº **02.049.630.**

2. FUNDAMENTO DE LA RESOLUCION No. 41832

La Resolución 41832 establece en su artículo sexto que, las reivindicaciones 1 a 6 y 12 a 17, contenidas en los folios 337 a 341, no cumplen con el requisito de nivel inventivo, la nueva reivindicación 7 relaciona materia que no se considera una invención, las nuevas reivindicaciones 8, 9, 10 y 16 no definen la materia para la cual solicitan invención y la nueva reivindicación 11 no guarda unidad de invención.

3. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Presento a su Despacho las siguientes consideraciones que justifican la revocatoria de la Resolución Nº 41832 del 13 de diciembre de 2007:

3.1 Objeto de la invención

En la Resolución Nº 41832, ese Despacho establece como objeto de la invención una "una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985... y que comprende un inserto y por lo menos una secuencia nucleótida seleccionada a partir del grupo de SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:17 y SEQ ID N°:18".

El solicitante discrepa de ese Despacho toda vez que sostiene que la presente invención está dirigida a **la inserción MON15985**, caracterizada por las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, o por las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12. Las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 están ligadas físicamente de tal manera que la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, es un diagnóstico de la presencia de cada una de las otras secuencias también. Es decir, la célula vegetal resistente a insectos reivindicada comprende un inserto Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, estando dicho objeto claramente reflejado en la reivindicación dependiente 2.

3.2 Excepciones de Patentabilidad

Este Despacho considera que la reivindicación 7 se relaciona con un proceso esencialmente biológico que depende exclusivamente de la naturaleza y, por ello, el objeto al que se hace referencia en dicha reivindicación no constituye una invención. Argumenta este Despacho que el primer paso (a) de la reivindicación 7, que comprende el cruzamiento de una planta resistente con una planta no resistente, es el elemento central de la reivindicación de método y comprende un proceso biológico natural que depende exclusivamente de la naturaleza.

Respetuosamente, manifiesto mi desacuerdo puesto que la reivindicación 7 se refiere a un método para producir una planta de algodón por cruzamiento de una planta resistente a insectos que comprende las SEQ ID N°:14-18 con una planta de algodón diferente, con lo cual se obtiene al menos una planta de progenie y, seleccionar la progenie que es resistente a insectos y comprende las SEQ ID N°:14-18. El algodón es un sistema de polinización cerrado; sin la intervención humana, no se puede producir un endogámico o híbrido transgénico. Es decir, la intervención humana es absolutamente necesaria para el paso de cruzamiento (a) de la reivindicación 7; y dicho paso no es un proceso biológico natural, como argumenta su Despacho.

Adicionalmente, la reivindicación 7 comprende además un paso de seleccionar la progenie que comprenda las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N°:14-18, donde dichas secuencias son secuencias novedosas de ADN de unión al transgen genómico debido a la inserción del transgen. Ciertamente, este paso requiere de una intervención técnica humana, ya que no todas las plantas de la progenie van a contener la inserción MON15985 de la presente invención y se necesita un paso de análisis para rastrear las plantas de progenie que contienen la inserción MON15985.

En conclusión, la reivindicación 7 no recae en la excepción de patentabilidad establecida por el artículo 15. b) de la Decisión 486.

3.3 Claridad de la solicitud

Si bien el solicitante no está de acuerdo con la posición de este Despacho en cuanto a la reivindicación 1, esto es, que la misma se refiere a una célula caracterizada por un elemento vegetal no patentable y que por ello no está definida correctamente, el solicitante manifiesta que desiste de esta reivindicación y que solicita la concesión parcial para el resto del pliego reivindicatorio.

En cuanto a las objeciones a la claridad de las reivindicaciones 8-10 y 16 porque las mismas contienen "términos no precisos" tales como "al menos" y "una fracción de", que abracarían un objeto que excede la revelación y que aún podría existir espontáneamente en la naturaleza.

Como se había dicho anteriormente, el significado de los términos "al menos" y "una porción de", con referencia a una sonda o a un cebador que es específico para detectar la inserción MON15985, no son ambiguos para un especialista en la técnica, y que tales términos son de uso común cuando se describen sondas o cebadores. Sería injustamente limitativo si las reivindicaciones se restringieran a una secuencia precisa.

Adicionalmente, las sondas/cebadores de las reivindicaciones 8-10 y el conjunto de elementos [kit] para detección de ADN de la reivindicación 16 derivan de las secuencias de unión o de amplicones que son únicas para la inserción MON15985. Dicho evento de inserción comprende modificaciones genéticas y no aparece en la naturaleza. Como tales, las moléculas de ADN a las cuales se hace referencia en las reivindicaciones 8-10 y 16 no existen espontáneamente en la naturaleza.

3.4 Unidad de Invención

La resolución 41832 afirma que las reivindicaciones 2 y 3 están dirigidas a "una célula vegetal resistente a insectos que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias indicadas en la SEQ ID N°:14, SEQ ID N°;15, SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:17, SEQ ID N°:18, SEQ ID N°:11, SEQ ID N°:12".

Manifiesto a ese Despacho que la afirmación anterior es incorrecta. Según se explicara precedentemente, la célula vegetal transgénica reivindicada comprende un inserto de Cry2Ab y las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 (véase la reivindicación pendiente 2) o comprende un inserto de Cry2Ab y ambas secuencias de los amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12 (véase la reivindicación pendiente 3). Estas reivindicaciones no se refieren a una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias de unión o de amplicones como erradamente interpreta este Despacho.

Por otra parta la Resolución también sostiene que el elemento común de las SEQ ID N°:14, 15, 16, 17, 18, 11 y 12 es que todas ellas pueden acompañar al gen Cry2Ab en el inserto empleado para la transformación de las plantas de algodón y que dicho elemento en común no debería considerarse como "el elemento común inventivo que vincule a todos los insertos de ADN con los que se pueden transformar las células

reivindicadas, y en ese sentido las diferentes células caracterizadas mediante distintos insertos posibles no guardan unidad de invención entre ellas".

De lo anterior, ese Despacho parece sugerir que los diferentes insertos de ADN existen en la presente invención debido a las diferentes secuencias de unión o de amplicones. Adicionalmente, caracteriza las células vegetales reivindicadas como que contienen "diferentes insertos posibles".

El solicitante respetuosamente expresa su desacuerdo y afirma que es incorrecto sugerir/describir como diferentes "insertos de ADN" o "diferentes insertos posibles" en el evento MON15985 particular. Con mayor detalle, ese Despacho parece considerar que las diferentes secuencias de unión o secuencias de amplicones podrían existir en diferentes células vegetales transgénicas y, por ello, conducirían a diferentes células que contiene diferentes insertos posibles. En otras palabras, parece considerar que las presentes reivindicaciones abarcan una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:14; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:15; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:16; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:17; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:18; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:11; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:12.

Esta interpretación de su Despacho contradice evidentemente el objeto de la presente invención, el cual se relaciona con una célula vegetal transgénica que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o una célula vegetal transgénica que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12. Una célula que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:14-18 (secuencias de unión) incluye en realidad una célula que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:11 y 12 (secuencias de amplicones). Las 7 células vegetales diferentes mencionadas por su Despacho son en verdad una misma célula. No existen "diferentes células caracterizadas por diferentes insertos posibles" como afirma su Despacho en la Resolución No. 41832.

Adicionalmente este Despacho considera que "las secuencias mencionadas arriba deberían presentar tanto una estructura común como una misma actividad, para poder considerarlas como un único objeto de invención. En este sentido, sería estrictamente necesario que dicha estructura común representara verdaderamente un salto cualitativo sobre la formulación de la regla técnica. De lo contrario, no existiría una característica

común nueva e inventiva que pudiese vincular a todas las posibles invenciones aquí reivindicadas, pero sobretodo, ninguna de las combinaciones posibles de Crya2b-SEQ ID No14 a 17 sería patentable, porque (sic) no cumpliría con el requisito de nivel inventivo"..

Respetuosamente, manifiesto mi desacuerdo ya que, como se argumentó previamente y se reitera en la presente, las SEQ ID N°:14, 15, 16, 17 y 18 son secuencias de unión y las SEQ ID N°:11 y 12 son secuencias de amplicones que son únicas para la inserción MON15985. La FIG. 1 modificada presentada previamente y adjunta nuevamente en la presente ilustra claramente la relación entre estas secuencias. Entonces, afirmo que la presente solicitud establece una única invención: el evento de algodón MON15985 que contiene un grupo selecto de marcadores (es decir, las secuencias de unión o de amplicones) como resultado de la inserción del ADN transgénico en el genoma. La detección de cualquiera de estos marcadores en una muestra conocida proveniente de semillas de algodón o de otro tejido de algodón es diagnóstico de la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra. Todas las secuencias están ligadas físicamente (véase, la FIG. 1 modificada), donde la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, también la presencia de cada una de las otras secuencias. Como tales, las cinco secuencias de unión o las dos secuencias de amplicones co-existen en la planta transgénica reivindicada y deberían examinarse juntas como una sola invención.

Adicionalmente, manifiesto que tampoco existen las denominadas "posibles combinaciones de Cry2Ab-SEQ ID N°:14 a 17" como afirma este Despacho, toda vez que porque solamente existe una combinación en la presente invención, es decir, la combinación de Cry2Ab-SEQ ID N°:14-17 (que abarca la combinación de Cry2Ab-SEQ ID N°:11-12).

Así entonces, parece que su Despacho se concentra en establecer una "estructura común" entre las SEQ ID N°:14-17 cuando evalúa la unidad de invención, en tanto el elemento común de las cinco secuencias de unión es que están ligadas físicamente y que no existen separadas entre sí en la presente invención.

En conclusión, la presente solicitud sí involucra un único concepto inventivo y por lo tanto sí cumple con lo estipulado por el Artículo 25 de la Decisión 486.

3.5 Nivel Inventivo

En la Resolución 41832, ese Despacho considera que las reivindicaciones 1-3 y sus dependientes (es decir, las reivindicaciones 1-6) carecen de Actividad Inventiva con respecto a D1-D5 y D7.

En cuanto a D1-D4, estas referencias simplemente mencionan los términos BollgardII®, DP50BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX sin hacer revelación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID NOs:11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

D5 revela el impacto del algodón que expresa una o dos endotoxinas de B. thuringiensis sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de Lepidoptera. En esta referencia se citan dos eventos que expresan Cry2Ab y Cry1Ac, MON15985, y MON15813. Estos eventos son idénticos excepto con referencia a la caracterización molecular del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Aunque se menciona que MON15985 es uno de los cultivares primarios usados en sus ensayos, en D5 no se revela ninguna secuencia que diagnostique la inserción MON15985. Es decir, que D5 no contiene revelación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

D7 revela el método de expresar δ-endotoxina Cry2A localizada en un organela o compartimiento subcelular en plantas y plantas que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica una δ-endotoxina Cry2A. Aunque revela la co-expresión de Cry2Ab y otra δ-endotoxina Cry B. de thuringiensis, D7 no divulga el evento MON15985 ni secuencia alguna que diagnostique la inserción MON15985. Es decir, en D7 SEQ ID NOs:14-18 o las secuencias de amplicones de SEQ ID NOs:11 y 12.

Como se ha argumentado previamente y se vuelve a enfatizar en la presente, la simple referencia a MON15985 o la divulgación de la coexpresión de Cry2Ab con otra endotoxina, en D1-D5 y D7 no eliminan la Actividad Inventiva de la presente invención tal como se reivindica por las siguientes razones:

(1) la simple referencia del evento MON15985 es puramente arbitraria y carece de significado técnico alguno. Sin una divulgación de las características estructurales exclusivas que pueden ser usadas para identificar el evento MON15985, una persona versada en la materia no podría poner en práctica las reivindicaciones de la presente invención. La simple mención del término MON15985 no constituye "el conocimiento técnico" suficiente del objeto para alcanzar la presente invención; y

(2) cada evento transgénico tiene características únicas, que incluyen secuencias de unión o de amplicón únicas suficientes para caracterizar el evento. La presente invención revela, por primera vez, las secuencias de unión SEQ ID NOs:14-18 así como las secuencias de amplicón SEQ ID NOs:11-12 que comprenden las secuencias de unión que se indican en SEQ ID NOs:14–18 que son exclusivas del evento MON15985 y, por lo tanto, proveen la capacidad, por primera vez, de detectar específicamente el evento particular MON15985 en una muestra de algodón. Ninguno de los documentos D1-D5 o D7, ni solos ni en combinación, proveen "el conocimiento técnico" del evento MON15985, y menos aún la capacidad de detectar específicamente dicho evento en una muestra de algodón.

Adicionalmente, este Despacho considera que las reivindicaciones 12-15 carecen de actividad Inventiva respecto del documento D6. En respuesta, el solicitante respetuosamente expresa su desacuerdo y argumenta que D6 revela un método PCR para detectar el ADN de soja RoundUp Ready™ en una forma específica por línea. En D6 no se enseña ni sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que incluya las secuencias de unión de SEQ ID NOs:14-18, o las secuencias de amplicones de SEQ ID NOs:11 y 12. Sin contener una descripción de las características técnicas específicas de la inserción MON15985, D6, aunque provea un método PCR de detectar una línea específica de organismos genéticamente modificados (GMO), no provee una motivación para un método de detectar el evento de inserción en algodón como se revindica en la presente solicitud.

Además, como cada evento transgénico es único, un método usado para detectar una línea específica de GMO no necesariamente funciona para la detección de otro evento. En el presente caso, el evento MON15985 es un evento único caracterizado por las secuencias de unión exclusivas SEQ ID NOs:14-18 y las secuencias de amplicones SEQ ID NOs:11-12, que se revelan en la presente invención por primera vez. El método de la invención usado para detectar el evento MON15985 no se deriva en forma evidente del arte previo porque en el estado de la técnica, tal como se describe en D1-D7, no se revelan las características técnicas del evento. A falta de una descripción de las características técnicas del evento, una persona versada en la técnica no podría diseñar una sonda/cebador que sea específico del evento MON15985 y a continuación producir un método para detectar el evento MON15985. Así entonces, la posición de este Despacho con relación a que cualquier persona que conozca cómo usar la técnica de PCR estaría motivada a detectar cualquier evento de inserción sin tener en cuenta si estos eventos son conocidos en el arte carece de base alguna.

En este orden de ideas, la presente solicitud si tiene altura inventiva toda vez que una persona versada en la materia técnica no llegaría a la presente invención a partir de

los documentos citados pues ninguno de estos enseña o sugiere el evento MON15985 caracterizado por las secuencias de unión exclusivas SEQ ID NOs:14-18 y las secuencias de amplicones SEQ ID NOs:11-12.

3.6 Comentarios a la respuesta del solicitante

- Considero que es inaceptable confundir los requisitos de novedad con los de Actividad Inventiva, como supuestamente lo hizo el solicitante en su respuesta previa. A este comentario aclaro que el solicitante en efecto se refirió a las enseñanzas combinadas **D1-D7** en su contestación anterior. Deseo enfatizar además que el "conocimiento técnico" de una persona con conocimientos normales en el arte respecto del evento MON15985 se derivaría directamente de las enseñanzas **D1-D7**, las cuales simplemente mencionan el término MON15985, sugieren la co-expresión de Cry2Ab y otra endotoxina, o revelan una técnica de PCR específica para detectar una línea específica de organismos genéticamente modificados. Como ninguno de los documentos **D1-D7** revela las características técnicas del evento MON15985, ni siquiera en combinación, los mismos no proveen el "conocimiento técnico" del evento MON15985.

- La resolución 41832 también aduce que "no era necesario que se divulgaran las secuencias diagnósticas, puesto que la forma en la que éstas fueron determinadas por el solicitante es bien conocida por cualquier técnico versado en la materia, quien puede llegar a ellas sin ninguna dificultad. Los procedimientos empleados constituyen métodos de primera elección para cualquier técnico del campo tecnológico al cual pertenece la primera invención". Como respuesta, el solicitante expresa respetuosamente su desacuerdo. Sin conocer las secuencias estructurales de diagnóstico del evento MON15985, una persona versada en la materia no sabría cómo identificar o detectar tal evento. La única información divulgada en el arte previo, incluidas las referencias citadas D1-D7, para el versado en la materia era que el evento MON15985 y el evento MON15813 expresaban dos proteínas insecticidas diferentes, Cry2Ab and Cry1Ac. Esta información por sí sola no provee al versado en la materia un conocimiento de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas. No se reveló información alguna sobre la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab ni tampoco la posición relativa del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Como no se conocían las secuencias de nucleótidos que codifican la Cry2Ab, se carecía del conocimiento técnico suficiente sobre el evento MON15985 para que el técnico versado en el arte pudiera identificar las secuencias reivindicadas y no se hubieran podido identificar sin las enseñanzas de la presente invención. Considerando que el evento MON15985 y los eventos MON15813 son idénticos salvo por la posición del ADN insertado que codifica la proteína Cry2Ab dentro del genoma de algodón, la persona versada en el arte no podría distinguir un

evento del otro sin las enseñanzas de la presente invención. Por lo tanto, el objeto reivindicado en la presente invención es novedoso y presenta Actividad Inventiva.

Además, el conocimiento técnico relativo a un evento no se traduce en otro evento. Cada evento es único y se caracteriza por secuencias de diagnóstico únicas. Según este Despacho, una persona que identifique el evento A podría fácilmente identificar el evento B. Según este razonamiento, no se podría otorgar ninguna patente en el futuro en relación con ningún otro evento porque la identificación y/o detección de cualquier otro evento sería obvia a partir del conocimiento sobre el evento A. Claramente esta posición carece de mérito.

Así entonces, con los argumentos que aquí presento, las objeciones por nivel inventivo de la solicitud se deben tener por superadas y, es claro que La presente invención sí proporciona un aporte al estado de la técnica toda vez que no pudo haberse derivado de los documentos citados por el examinador y, por lo tanto una persona medianamente versada en la materia técnica no llegaría a la solución aquí propuesta partiendo de los documentos D1a D7.

Habiendo quedado sustentada el nivel inventivo de la solicitud, solicito a su Despacho que revoque la resolución 41832 y se otorgue el privilegio de patente a la invención titulada **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO"**

4. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Fundamento el presente recurso en las siguientes normas:

- Artículos 15. b), 25, 30 y 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

5. PETICIÓN

Solicito a su Despacho que con fundamento en los hechos y normas citadas:

1. Se revoque la resolución No. **41832** del 13 de diciembre de 2007 en cuanto a la negación del privilegio de patente de invención.

2. Que como consecuencia de la revocación, se otorgue el privilegio de patente a la invención titulada **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO"**

6. PRUEBAS

Solicito que se tengan como tales, los documentos contenidos en el Expediente No. **02.049.630** de la referencia, en el que se presentó la solicitud de privilegio de patente para la invención titulada **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO"** a nombre de la sociedad **MONSANTO TECHNOLOGY LLC.**

382

NOTIFICACIONES

Las recibiré en la Secretaría de su Despacho y en mi oficina en la **Calle 94 A No. 7 A-09**, teléfono 610 7420.

Del Señor Superintendente, Atentamente,

Margarita Castellanos Abondano
T.P.A. No. **70819** del C. Sup. de la Judicatura.
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
Calle 94 A No. 7 A-09
Teléfono: 610 7420 - 610 7480

Bogotá, D.C.
PATENTES/15/P1529/RECURSO

AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
... Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
... esta ciudad compareció personalmente:
Margarita Castellanos Abondano
identificado con C.C. 39 779 654
expedida en: Usaquén y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. 70819 del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
rigido a Sup. Ind. Com.
y declaró que la firma puesta en éste escrito es
suya.

Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 17 ENE. 2008

AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
NOTARIO ENCARGADO
ANDRÉS FERNANDO RODRIGUEZ OLIVOS
OFC AU

12

384/383

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
RESPUESTA A RECURSO DE REPOSICIÓN

2020
Bogotá, D.C.,

Abogada
Margarita Castellanos Abondano

REFERENCIA:	Radicación No.	02-49630
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	
	Folios	006

TÍTULO: "Planta evento de algodón MON15985 y composiciones y métodos para detección del mismo."

En atención al Recurso de Reposición interpuesto, se hacen las siguientes aclaraciones:

1. Documentos estudiados

1.1.	Descripción:	Folios: 66 a 146 como se radicó inicialmente.
1.2.	Reivindicaciones:	Folios: 337 a 341 como se radicó inicialmente.
1.3.	Otros:	Conceptos técnicos realizados. Respuestas del solicitante. Modificaciones al capítulo reivindicatorio.

2. Objeto de la Invención

El objeto de la presente solicitud se refiere al evento de algodón MON15985 que corresponde con una secuencia de inserción de Cry2Ab junto con las secuencias SEQ No. 11-12, 14-48.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC A61K 38/20.

3. Argumentos del solicitante

3.1. *Objeto de la Invención*

El solicitante argumenta que el objeto de su invención corresponde con el

evento de inserción MON1595 caracterizado por las SEQ No. 11-12 y 14-18, físicamente ligadas y expresadas en una célula vegetal y que dicho objeto se refleja en la cláusula dependiente 2.

3.2. *Excepciones a Patentabilidad*

Argumenta el recurrente que el procedimiento de la cláusula 7 no recae en la excepción a patentabilidad establecida por el artículo 15 literal b) de la Decisión 486 debido a que el cruzamiento de las plantas requiere necesariamente de la intervención humana.

3.3. *Claridad de la Solicitud*

El solicitante desiste de su pretensión acerca de la reclamación de la materia de la cláusula 1 ("*Una célula de planta de algodón resistente a insectos, derivada de una planta de algodón, en donde la semilla de dicha planta se ha depositado en el American Type Culture Collection, bajo el número de acceso PTA-2516*").
Argumenta igualmente el recurrente, que los términos utilizados por él para la definición de las cláusulas 8-10 y 16 son aceptados en el estado de la técnica y que las secuencias reclamadas no corresponden con materia presente en la naturaleza, al tratarse de amplicones y secuencias de unión únicas procedentes de modificaciones genéticas.

3.4. *Unidad de invención*

Manifiesta el solicitante que la célula transgénica reclamada comprende un inserto de Cry2Ab y las cinco secuencias de unión (14-18) o un inserto de Cry2Ab y las dos secuencias de amplicones de las SEQ No. 11 y 12 y que no se refiere a una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab más ADN que puede corresponder con cualquier de las secuencias de unión o de amplicones.
Igualmente se aclara que el objeto de la invención corresponde con una célula transgénica vegetal que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y todas las secuencias de unión identificadas como SEQ No. 14-18 o una célula vegetal que comprende un inserto de Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones identificadas como SEQ No. 11 y 12; y adicionalmente que una célula que comprende el inserto Cry2Ab junto con las secuencias de unión identificadas como SEQ No. 14-18 en realidad incluye una célula que comprende un inserto de Cry2Ab y las secuencias de amplicones 11 y 12.
Por último se afirma que la unidad de invención de la materia reclamada se soporta en el hecho de que las secuencias están físicamente ligadas, no existen de manera separada entre sí y todas identifican el evento de algodón MON15985, existiendo entonces una única inserción posible correspondiente a Cry2Ab-SEQ No. 14-17.

3.5. *Nivel Inventivo*

Argumenta el solicitante que los documentos D1-D4 simplemente mencionan los términos BollgardII®, DP50BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX sin hacer revelación alguna sobre las secuencias de unión SEQ No. 14-18 o las secuencias de amplicones SEQ No. 11 y 12, exclusivas del evento MON15985.

Por otro lado, expone el solicitante que el documento D5 revela el impacto de una planta transgénica de algodón que expresa una o dos endotoxinas bacterianas (MON15813 y MON 15985) sobre las larvas de Lepidoptera, sin hacer enseñanza alguna sobre las secuencias específicas de unión o amplicones exclusivas del evento MON15985.
Según las aclaraciones del recurrente el documento D7 revela el método de expresar la endotoxina Cry2A en células vegetales pero no hace referencia alguna la evento MON15985, o a secuencia que permitan sus diagnóstico.
Por último se afirma que los documentos D1-D4 y el documento D7 no afectan el Nivel Inventivo de la invención reclamada por cuanto: i) la referencia al evento MON15985 es puramente arbitraria y carece de sentido técnico alguno: sin una divulgación específica de las características estructurales exclusivas que pueden ser usadas para identificar el evento MON15985 una persona versada en la materia no podría poner en práctica las reclamaciones de la presente invención; y ii) cada evento transgénico tiene características únicas, que incluyen secuencia de unión o de amplicón únicas suficientes para caracterizar el evento y la presente invención revela por primera vez las secuencias de unión SEQ No. 14-18 así como las secuencias de amplicón SEQ No. 11 y 12; de manera que ninguno de los documentos D1-D7 ni solos, ni en combinación, proveen el conocimiento necesario del evento MON15985 y menos la capacidad para detectarlo en una muestra de algodón.

Respecto a las cláusulas 12-15 y su afectación con el documento D6 por nivel inventivo el solicitante indica éste revela un método de PCR para detectar el ADN de soja transgénica en una forma específica por línea, sin proveer motivación alguna sobre el evento MON15985 y su diagnóstico.

Concluye el solicitante que ninguno de los documentos citados por este despacho afecta el nivel inventivo de su invención.

4. Respuesta a los Argumentos del Solicitante

En atención a los argumentos del solicitante se hacen las siguientes aclaraciones:

4.1. *Excepciones a Patentabilidad*

Se aclara que la objeción realizada por este despacho corresponde al Artículo 15 de la Decisión 486 que establece la materia que **no** se considerará como una invención.
Dentro de estas consideraciones se encuentran los procesos biológicos naturales.
En la cláusula 7 se reclama un método para producir una planta de algodón resistente a insecto que comprende el cruzamiento entre plantas de algodón, la obtención de la menos una planta de la progenie de dicho cruce y la selección de plantas resistentes a insecto dentro de dicha progenie; este método se considera como un proceso biológico natural ya que su realización corresponde específicamente con el proceso natural de reproducción y sus resultados, y es éste el eje del procedimiento reclamado. Adicionalmente es un acontecimiento que aunque inducido o determinado por el hombre se da con o sin su

intervención. De esta manera tal como se reclamó no puede considerarse una invención.

4.2. *Claridad de la Solicitud*

Este despacho reitera su posición sobre los términos ambiguos e imprecisos que utiliza la solicitud y que son considerados como tal toda vez que no permiten establecer claramente el objeto y el alcance de las reclamaciones. En la experiencia de un técnico versado en la materia podrían ser de uso habitual pero para la definición clara y concisa de un desarrollo carecen de veracidad.

4.3. *Unidad de Invención*

A las aclaraciones del solicitante sobre las secuencias reclamadas y su característica de continuidad física este despacho debe enfatizar en el hecho de que de tratarse secuencias físicamente ligadas, continuas y en todo evento presentes, corresponderían exactamente a una única secuencia, en ningún caso reclamada como tal. Adicionalmente porque las secuencias llamadas por el solicitante de "amplicones" incluyen las secuencias de unión, de manera que la reclamación debiese haber correspondido con una construcción específica de secuencia única.
Sin haberse reclamado como tal las secuencias se entienden como independientes presentes, ausentes o en combinación en el evento y que al diferir estructuralmente originan diferentes inserciones.

De esta manera la objeción realizada por este despacho tiene como fundamento la forma en que el mismo solicitante presento su invención y la reclamó. Al presentar diferentes secuencias como características del evento se reclamaron desarrollos independientes.

4.4. *Nivel Inventivo*

Se resumen las divulgaciones de las anterioridades citadas (D1 – D7) como sigue:

- D1 divulga variedades transgénicas de algodón que contiene el inserto Cry2Ab.

- D2 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard II™ que expresa las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab.

- D3 divulga cultivares de algodón transgénico que expresan las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab, correspondientes con los eventos MON15985 y MON15813.

- D4 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard II.

- D5 divulga un algodón transgénico que expresa dos proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab, denominado MON15985.

- D6 presenta un método de detección específica de organismos genéticamente modificados (GMO) que no requiere conocer la secuencia del segmento de ADN insertado.

- D7 enseña segmentos de ácidos nucleicos que comprenden la proteína Cry2Ab y se insertan en vectores de expresión y en plantas.

Teniendo en cuenta: 1) que las cláusulas 1-17 de la presente solicitud reclaman una célula de planta de algodón resistente a insectos, que corresponde con la inserción MON1595 según las SEQ No. 11, 12 y 14-18, el ADN codificante de dicha inserción y el método y kit de detección de la misma; 2) que los documentos arriba resumidos indican la inserción de genes de resistencia a insectos en plantas de algodón, genes además ampliamente conocidos en el estado de la técnica; 3) y que siendo el evento MON15985 una derivación de un evento anterior, (ambos indicados con anterioridad), al que se le han cambiado las secuencias de unión y que esto no puede ser considerado como un aporte inventivo, es indiscutible que la materia reclamada es anticipada por las anterioridades citadas. El mejoramiento de una inserción sin asocio a un aporte extraordinario no puede entenderse como inventivo, además de que la determinación de secuencias de unión de genes objetivo conocidos, como los de resistencia a insectos, se constituye como una práctica normal en el estado de la técnica.
Para un técnico versado en la materia, conociendo el origen de la inserción y el gen exógeno insertado es posible determinar cebadores y secuencias de unión que mejoren la inserción, inclusive sin conocerlas podría determinarlas, definir cebadores para las mismas y posteriormente detectarlas; la aplicación de técnicas conocidas a eventos puntuales no las hace inventivas.
De esta manera, el hecho de que los documentos citados no especifiquen la secuencia del evento MON15985, a la luz de que son las secuencias de unión y no la inserción como tal el núcleo de la invención y que las secuencias de genes de resistencia a insectos y su inserción son de dominio y conocimiento de un técnico versado en la materia el aporte o mejoramiento de un evento anterior no puede considerarse inventivo.

En conclusión, todos los documentos solos o en combinación, junto con los conocimientos de un técnico versado en la materia destruyen el nivel inventivo del capítulo reivindicatorio solicitado.

5. Conclusión

Teniendo en cuenta lo anterior, se recomienda ratificar la negación del privilegio solicitado para las reivindicaciones 1-17, folios 337-341.

CONCEPTO TÉCNICO No. 893	JEFE DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202081

389
388

/103

AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación :	2-49630- -19-0 Fecha: 2008-05-29 08:18:38
Trámite :	2 PATENTES
Evento :	1 REGDEPOSITO
Actuación :	432 COMUNICACTOADM
Destinatario :	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO Folios 1

Señor (a) (es)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
CALLE 94 A NO. 7 A-09
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION :	16488
Fecha :	28/05/2008
Expediente :	2-49630
Trámite :	2 PATENTES DE INVENCION
Evento :	1 REGISTRO/DEPOSITO/CONCESION/DEPOSITO
Actuación :	432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comedidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea - caracter general - consulta actos administrativos.

Secretaría General
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

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

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Cra 50 No. 26-55 Int 2 PBX: 3820840
Fax: 3 82 26 95 3 50 52 20. Línea 018000 910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

390
389

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 10468
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
en ejercicio de sus facultades legales, especialmente de las que se confirieron en el articulo 4, numeral 5, del decreto 2153 de 1992, y

CONSIDERANDO

PRIMERO: Que mediante Resolución 41832 del 13 de diciembre de 2007, la Superintendencia de Industria y Comercio, negó el privilegio de patente de invención a la creación denominada: "PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DEL MISMO".

SEGUNDO: Que mediante escrito radicado en esta entidad el 17 de enero de 2008, bajo el número 02 049630 00017 0000, la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC, interpuso recurso de reposición contra la decisión contenida en la citada resolución, con el objeto de que "se revoque la resolución recurrida y, en su lugar, se conceda el privilegio de patente de invención.

TERCERO: Que el recurso a que hace referencia el ordinal anterior se fundamentó, en síntesis, de la siguiente manera:

Argumenta la recurrente: "En la Resolución N° 41832, ese Despacho establece como objeto de la invención 'una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985... y que comprende un inserto y por lo menos una secuencia nucleótida seleccionada a partir del grupo de SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:17 y SEQ ID N°:18'.

"El solicitante discrepa de ese Despacho toda vez que sostiene que la presente invención está dirigida a **la inserción MON15985**, caracterizada por las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, o por las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12. Las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 están ligadas físicamente de tal manera que la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, es un diagnóstico de la presencia de cada una de las otras secuencias también. Es decir, la célula vegetal resistente a insectos reivindicada comprende un inserto Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ *ID N°:14-18,* estando dicho objeto claramente reflejado en la reivindicación dependiente 2.

"Este Despacho considera que la reivindicación 7 se relaciona con un proceso esencialmente biológico que depende exclusivamente de la naturaleza y, por ello, el objeto al que se hace referencia en dicha reivindicación no constituye una invención. Argumenta este Despacho que el primer paso (a) de la reivindicación 7, que

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 16403
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

comprende el cruzamiento de una planta resistente con una planta no resistente, es el elemento central de la reivindicación de método y comprende un proceso biológico natural que depende exclusivamente de la naturaleza.

"Respetuosamente, manifiesto mi desacuerdo puesto que la reivindicación 7 se refiere a un método para producir una planta de algodón por cruzamiento de una planta resistente a insectos que comprende las SEQ ID N°:*14-18* con una planta de algodón diferente, con lo cual se obtiene al menos una planta de progenie y, seleccionar la progenie que es resistente a insectos y comprende las SEQ ID N°:14-18. El algodón es un sistema de polinización cerrado; sin la intervención humana. No se puede producir un endogámico o híbrido transgénico. Es decir, la intervención humana es absolutamente necesaria para el paso de cruzamiento (a) de la reivindicación 7; y dicho paso no es un proceso biológico natural, como argumenta su Despacho.

"Adicionalmente, la reivindicación 7 comprende además un paso de seleccionar la progenie que comprenda las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N°:14-18, donde dichas secuencias son secuencias novedosas de ADN de unión al transgen genómico debido a la inserción del transgen. Ciertamente, este paso requiere de una intervención técnica humana, ya que no todas las plantas de la progenie van a contener la inserción MON15985 de la presente invención y se necesita un paso de análisis para rastrear las plantas de progenie que contienen la inserción MON15985. En conclusión, la reivindicación 7 no recae en la excepción de patentabilidad establecida por el artículo 15. b) de la Decisión 486.

"Si bien el solicitante no está de acuerdo con la posición de este Despacho en cuanto a la reivindicación 1, esto es, que la misma se refiere a una célula caracterizada por un elemento vegetal no patentable y que por ello no está definida correctamente, el solicitante manifiesta que desiste de esta reivindicación y que solicita la concesión parcial para el resto del pliego reivindicatorio.

"En cuanto a las objeciones a la claridad de las reivindicaciones 8-10 y 16 porque las mismas contienen 'términos no precisos' tales como 'al menos' y 'una fracción de', que abarcarían un objeto que excede la revelación y que aún podría existir espontáneamente en la naturaleza.

"Como se había dicho anteriormente, el significado de los términos 'al menos' y 'una porción de', con referencia a una sonda o a un cebador que es específico para detectar la inserción MON15985, no son ambiguos para un especialista en la técnica, y que tales términos son de uso común cuando se describen sondas o cebadores. Sería injustamente limitativo si las reivindicaciones se restringieran a una secuencia precisa.
"La resolución 41832 afirma que las reivindicaciones 2 y 3 están dirigidas a 'una célula vegetal resistente a insectos que comprende una secuencia que codifica

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 10468
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias indicadas en la SEQ ID N°:14, SEQ ID N°;15, SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:17, SEQ ID N°:18, SEQ ID N°:11, SEQ ID N°:12'.

"Manifiesto a ese Despacho que la afirmación anterior es incorrecta. Según se explicara precedentemente, la célula vegetal transgénica reivindicada comprende un inserto de Cry2Ab y las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 (véase la reivindicación pendiente 2) o comprende un inserto de Cry2Ab y ambas secuencias de los amplicones de las SEQ ID W: 11 y 12 (véase la reivindicación pendiente 3). Estas reivindicaciones no se refieren a una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + ADN que puede estar representado por cualquiera de las secuencias de unión o de amplicones como erradamente interpreta este Despacho.

"Por otra parta la Resolución también sostiene que el elemento común de las SEQ ID N°: 14, 15, 16, 17, 18, 11 Y 12 es que todas ellas pueden acompañar al gen Cry2Ab en el inserto empleado para la transformación de las plantas de algodón y que dicho elemento en común no debería considerarse como 'el elemento común inventivo que vincule a todos los insertos de ADN con los que se pueden transformar las células reivindicadas, y en ese sentido las diferentes células caracterizadas mediante distintos insertos posibles no guardan unidad de invención entre ellas'.

"De lo anterior, ese Despacho parece sugerir que los diferentes insertos de ADN existen en la presente invención debido a las diferentes secuencias de unión o de amplicones. Adicionalmente, caracteriza las células vegetales reivindicadas como que contienen "diferentes insertos posibles'.

"El solicitante respetuosamente expresa su desacuerdo y afirma que es incorrecto sugerir/describir como diferentes 'insertos de ADN' o 'diferentes insertos posibles' en el evento MON15985 particular. Con mayor detalle, ese Despacho parece considerar que las diferentes secuencias de unión o secuencias de amplicones podrían existir en diferentes células vegetales transgénicas y, por ello, conducirían a diferentes células que contiene diferentes insertos posibles. En otras palabras, parece considerar que las presentes reivindicaciones abarcan una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:14; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:15; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:16; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:17; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°: 18; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:11; y una célula vegetal que comprende una secuencia que codifica Cry2Ab + la SEQ ID N°:12.

"Esta interpretación de su Despacho contradice evidentemente el objeto de la

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 16163
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

presente invención, el cual se relaciona con una célula vegetal transgénica que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o una célula vegetal transgénica que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 v 12. Una célula que comprende un inserto que codifica Cry2Aby las SEQ ID N°:14-18 (secuencias de unión) incluye en realidad una célula que comprende un inserto que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:11 y 12 (secuencias de amplicones). Las 7 células vegetales diferentes mencionadas por su Despacho son en verdad una misma célula. No existen 'diferentes células caracterizadas por diferentes insertos posibles' como afirma su Despacho en la Resolución No. 41832.

"Adicionalmente este Despacho considera que 'las secuencias mencionadas arriba deberían presentar tanto una estructura común como una misma actividad, para poder considerarlas como un único objeto de invención. En este sentido, sería estrictamente necesario que dicha estructura común representara verdaderamente un salto cualitativo sobre la formulación de la regla técnica. De lo contrario, no existiría una característica común nueva e inventiva que pudiese vincular a todas las posibles invenciones aquí reivindicadas, pero sobretodo, ninguna de las combinaciones posibles de Crya2b-SEQ ID N°14 a 17 sería patentable, porque (sic) no cumpliría con el requisito de nivel inventivo'.

"Respetuosamente, manifiesto mi desacuerdo ya que, como se argumentó previamente y se reitera en la presente, las SEQ ID N°:14, 15, 16, 17 Y 18 son secuencias de unión y las SEQ ID N°:11 y 12 son secuencias de amplicones que son únicas para la inserción MON15985. La Fig 1 modificada presentada previamente y adjunta nuevamente en la presente ilustra claramente la relación entre estas secuencias. Entonces, afirmo que la presente solicitud establece una única invención: el evento de algodón MON 15985 que contiene un grupo selecto de marcadores (es decir, las secuencias de unión o de amplicones) como resultado de la inserción del ADN transgénico en el genoma. La detección de cualquiera de estos marcadores en una muestra conocida proveniente de semillas de algodón o de otro tejido de algodón es diagnóstico de la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra. Todas las secuencias están ligadas físicamente (véase, la Fig. 1 modificada), donde la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, también la presencia de cada una de las otras secuencias. Como tales, las cinco secuencias de unión o las dos secuencias de amplicones co-existen en la planta transgénica reivindicada y deberían examinarse juntas como una sola invención.

"Adicionalmente, manifiesto que tampoco existen las denominadas 'posibles combinaciones de Cry2Ab-SEQ ID N°:14 a 17' como afirma este Despacho, toda vez que porque solamente existe una combinación en la presente invención, es decir, la combinación de Cry2Ab-SEQ ID N°:14-17 (que abarca la combinación de Cry2Ab-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN N°. 16103
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

SEQ ID N°:11-12).

"Así entonces, parece que su Despacho se concentra en establecer una 'estructura común' entre las SEQ ID N°:14-17 cuando evalúa la unidad de invención, en tanto el elemento común de las cinco secuencias de unión es que están ligadas físicamente y que no existen separadas entre sí en la presente invención.

"En conclusión, la presente solicitud sí involucra un único concepto inventivo y por lo tanto sí cumple con lo estipulado por el Artículo 25 de la Decisión 486.

"En la Resolución 41832, ese Despacho considera que las reivindicaciones 1-3 y sus dependientes (es decir, las reivindicaciones 1-6) carecen de Actividad Inventiva con respecto a D1-D5 y D7.

"En cuanto a D1-D4, estas referencias simplemente mencionan los términos BOllgardll®, DP50BII, MON15985, DPL 15985 y/o DP50BX sin hacer revelación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°s:11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

"D5 revela el impacto del algodón que expresa una o dos endotoxinas de B. thuringiensis sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de Lepidóptera. En esta referencia se citan dos eventos que expresan Cry2Ab y Cry1Ac, MON15985, y MON 15813. Estos eventos son idénticos excepto con referencia a la caracterización molecular del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Aunque se menciona que MON15985 es uno de los cultivares primarios usados en sus ensayos, en D5 no se revela ninguna secuencia que diagnostique la inserción MON15985. Es decir, que D5 no contiene revelación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

"D7 revela el método de expresar δ-endotoxina Cry2A localizada en un organela o compartimiento subcelular en plantas y plantas que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica una δ -endotoxina Cry2A. Aunque revela la co-expresión de Cry2Ab y otra δ -endotoxina Cry B. de thuringiensis, D7 no divulga el evento MON15985 ni secuencia alguna que diagnostique la inserción MON15985. Es decir, en D7 SEQ ID NOs:14-18 o las secuencias de amplicones de SEQ ID NOs:11 y 12.

"Como se ha argumentado previamente y se vuelve a enfatizar en la presente, la simple referencia a MON 15985 o la divulgación de la coexpresión de Crv2Ab con otra endotoxina, en D1-D5 v D7 no eliminan la Actividad Inventiva de la presente invención tal como se reivindica por las siguientes razones:

(1) la simple referencia del evento MON15985 es puramente arbitraria y carece de significado técnico alguno. Sin una divulgación de las características

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 16403
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

estructurales exclusivas que pueden ser usadas para identificar el evento MON15985, una persona versada en la materia no podría poner en práctica las reivindicaciones de la presente invención. La simple mención del término MON15985 no constituye "el conocimiento técnico" suficiente del objeto para alcanzar la presente invención; y

(2) cada evento transgénico tiene características únicas, que incluyen secuencias de unión o de amplicón únicas suficientes para caracterizar el evento. La presente invención revela, por primera vez, las secuencias de unión SEQ ID NOs: 14-18 así como las secuencias de amplicón SEQ ID NOs:11-12 que comprenden las secuencias de unión que se indican en SEQ ID NOs:14-18 que son exclusivas del evento MON15985 y, por lo tanto, proveen la capacidad, por primera vez, de detectar específicamente el evento particular MON15985 en una muestra de algodón. Ninguno de los documentos D1-D5 o D7, ni solos ni en combinación, proveen "el conocimiento técnico" del evento MON15985, y menos aún la capacidad de detectar específicamente dicho evento en una muestra de algodón.

"Adicionalmente, este Despacho considera que las reivindicaciones, 12-15 carecen de Actividad Inventiva respecto del documento D6. En respuesta, el solicitante respetuosamente expresa su desacuerdo y argumenta que D6 revela un método PCR para detectar el ADN de soja RoundUp ReadyTM en una forma específica por línea. En D6 no se enseña ni sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que incluya las secuencias de unión de SEQ ID NOs:14-18, o las secuencias de amplicones de SEQ ID NOs:11 y 12. Sin contener una descripción de las características técnicas específicas de la inserción MON15985, D6, aunque provea un método PCR de detectar una línea específica de organismos genéticamente modificados (GMO), no provee una motivación para un método de detectar el evento de inserción en algodón como se reivindica en la presente solicitud.

"Además, como cada evento transgénico es único, un método usado para detectar una línea específica de GMO no necesariamente funciona para la detección de otro evento. En el presente caso, el evento MON 15985 es un evento único caracterizado por las secuencias de unión exclusivas SEQ ID NOs:14-18 y las secuencias de amplicones SEQ ID NOs:11-12, que se revelan en la presente invención por primera vez. El método de la invención usado para detectar el evento MON 15985 no se deriva en forma evidente del arte previo porque en el estado de la técnica, tal como se describe en D1-D7, no se revelan las características técnicas del evento. A falta de una descripción de las características técnicas del evento, una persona versada en la técnica no podría diseñar una sonda/cebador que sea específico del evento MON 15985 y a continuación producir un método para detectar el evento MON15985. Así entonces, la posición de este Despacho con relación a que cualquier persona que conozca cómo usar la técnica de PCR estaría motivada a detectar cualquier evento de inserción sin tener en cuenta si estos eventos son conocidos en el arte carece de base alguna.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 16103
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

"En este orden de ideas, la presente solicitud si tiene altura inventiva toda vez que una persona versada en la materia técnica no llegaría a la presente invención a partir de los documentos citados pues ninguno de estos enseña o sugiere el evento MON15985 caracterizado por las secuencias de unión exclusivas SEQ ID NOs:14-18 y las secuencias de amplicones SEQ ID NOs:11-12.

"Considero que es inaceptable confundir los requisitos de novedad con los de Actividad Inventiva, como supuestamente lo hizo el solicitante en su respuesta previa. A este comentario aclaro que el solicitante en efecto se refirió a las enseñanzas combinadas **D1-D7** en su contestación anterior. Deseo enfatizar además que el 'conocimiento técnico' de una persona con conocimientos normales en el arte respecto del evento MON15985 se derivaría directamente de las enseñanzas D1-D7, las cuales simplemente mencionan el término MON15985, sugieren la co-expresión de Cry2Ab y otra endotoxina, o revelan una técnica de PCR específica para detectar una línea específica de organismos genéticamente modificados. Como ninguno de los documentos **D1-D7** revela las características técnicas del evento MON15985, ni siquiera en combinación, los mismos no proveen el 'conocimiento técnico' del evento MON15985.

"La resolución 41832 también aduce que 'no era necesario que se divulgaran las secuencias diagnósticas, puesto que la forma en la que éstas fueron determinadas por el solicitante es bien conocida por cualquier técnico versado en la materia, quien puede llegar a ellas sin ninguna dificultad. Los procedimientos empleados constituyen métodos de primera elección para cualquier técnico del campo tecnológico al cual pertenece la primera invención'. Como respuesta, el solicitante expresa respetuosamente su desacuerdo. Sin conocer las secuencias estructurales de diagnóstico del evento MON15985, una persona versada en la materia no sabría cómo identificar o detectar tal evento. La única información divulgada en el arte previo, incluidas las referencias citadas 01-07, para el versado en la materia era que el evento MON15985 y el evento MON15813 expresaban dos proteínas insecticidas diferentes, Cry2Ab and Cry1Ac. Esta información por sí sola no provee al versado en la materia un conocimiento de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas. No se reveló información alguna sobre la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab ni tampoco la posición relativa del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Como no se conocían las secuencias de nucleótidos que codifican la Cry2Ab, se carecía del conocimiento técnico suficiente sobre el evento MON15985 para que el técnico versado en el arte pudiera identificar las secuencias reivindicadas y no se hubieran podido identificar sin las enseñanzas de la presente invención. Considerando que el evento MON15985 y los eventos MON15813 son idénticos salvo por la posición del ADN insertado que codifica la proteína Cry2Ab dentro del genoma de algodón, la persona versada en el arte no podría distinguir un evento del otro sin las enseñanzas de la presente invención. Por lo tanto, el objeto reivindicado en la presente invención es novedoso y presenta Actividad Inventiva.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 1 0 1 0 3
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

"Además, el conocimiento técnico relativo a un evento no se traduce en otro evento. Cada evento es único y se caracteriza por secuencias de diagnóstico únicas. Según este Despacho, una persona que identifique el evento A podría fácilmente identificar el evento B. Según este razonamiento, no se podría otorgar ninguna patente en el futuro en relación con ningún otro evento porque la identificación y/o detección de cualquier otro evento sería obvia a partir del conocimiento sobre el evento A. Claramente esta posición carece de mérito.

"Así entonces, con los argumentos que aquí presento, las objeciones por nivel inventivo de la solicitud se deben tener por superadas y, es claro que la presente invención sí proporciona un aporte al estado de la técnica toda vez que no pudo haberse derivado de los documentos citados por el examinador y, por lo tanto una persona medianamente versada en la materia técnica no llegaría a la solución aquí propuesta partiendo de los documentos D1a D7.

"Habiendo quedado sustentada el nivel inventivo de la solicitud, solicito a su Despacho que revoque la resolución 41832 y se otorgue el privilegio de patente a la invención titulada **"PLANTA EVENTO DE ALGODÓN MON15985 y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DE MISMO"**

CUARTO: Que para atender lo señalado en el artículo 59 del Código Contencioso Administrativo es preciso resolver todas las cuestiones que hayan sido planteadas y las que aparezcan con motivo del recurso, en los siguientes términos:

NORMA APLICABLE

El artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Por su parte el articulo 18 de la Decisión 486 establece: "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

FRENTE AL CASO EN ESTUDIO

Examinadas nuevamente las actuaciones administrativas que cursan en este expediente se encuentra que la solicitud se refiere a una "PLANTA EVENTO DE ALGODON MON15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS PARA DETECCION DEL MISMO".

Respecto a los argumentos de la recurrente este Despacho se permite aclarar que la objeción realizada corresponde al Artículo 15 de la Decisión 486 que establece la

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 16408
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

materia que **no se** considerará como una invención. Dentro de estas consideraciones se encuentran los procesos biológicos naturales.

En la cláusula 7 se reclama un método para producir una planta de algodón resistente a insecto que comprende el cruzamiento entre plantas de algodón, la obtención de la menos una planta de la progenie de dicho cruce y la selección de plantas resistentes a insecto dentro de dicha progenie; este método se considera como un proceso biológico natural ya que su realización corresponde específicamente con el proceso natural de reproducción y sus resultados, y es éste el eje del procedimiento reclamado. Adicionalmente es un acontecimiento que aunque inducido o determinado por el hombre se da con o sin su intervención. De esta manera tal como se reclamó no puede considerarse una invención.

Este despacho reitera su posición sobre los términos ambiguos que utiliza la solicitud y que son considerados como tal toda vez que no permiten establecer claramente el objeto y el alcance de lo reclamado. En la experiencia de un técnico versado en la materia podría ser de uso habitual pero para la definición clara y concisa de un desarrollo carecen de veracidad.

A las aclaraciones del solicitante sobre las secuencias reclamadas y su característica de continuidad física este despacho debe enfatizar en el hecho de que de tratarse secuencias físicamente ligadas, continuas y en todo evento presentes, corresponderían exactamente a una única secuencia, en ningún caso reclamada como tal. Adicionalmente porque las secuencias llamadas por el solicitante de "amplicones" incluyen las secuencias de unión, de manera que la reclamación debiese haber correspondido con una construcción específica de secuencia única.

Sin haberse reclamado como tal las secuencias se entienden como independientes presentes, ausentes o en combinación en el evento y que al diferir estructuralmente originan diferentes inserciones.

De esta manera la objeción realizada por este despacho tiene como fundamento la forma en que el mismo solicitante presento su invención y la reclamó. Al presentar diferentes secuencias como características del evento se reclamaron desarrollos independientes.

Se resumen las divulgaciones de las anterioridades citadas (01 - 07) como sigue:

- D1 divulga variedades transgénicas de algodón que contiene el inserto Cry2Ab.

- D2 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard IITM que expresa las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 1608
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

- D3 divulga cultivares de algodón transgénico que expresan las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab, correspondientes con los eventos MON15985 y MON15813.

- D4 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard 11.

- D5 divulga un algodón transgénico que expresa dos proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab, denominado MON15985.

- D6 presenta un método de detección específica de organismos genéticamente modificados (GMO) que no requiere conocer la secuencia del segmento de AON insertado.

- D7 enseña segmentos de ácidos nucleicos que comprenden la proteína Cry2Ab y se insertan en vectores de expresión yen plantas.

Teniendo en cuenta: 1) que las cláusulas 1-17 de la presente solicitud reclaman una célula de planta de algodón resistente a insectos, que corresponde con la inserción MON 1595 según las SEQ No. 11, 12 Y 1418, el ADN codificante de dicha inserción y el método y kit de detección de la misma; 2) que los documentos arriba resumidos indican la inserción de genes de resistencia a insectos en plantas de algodón, genes además ampliamente conocidos en el estado de la técnica; 3) y que siendo el evento MON 15985 una derivación de un evento anterior, (ambos indicados con anterioridad), al que se le han cambiado las secuencias de unión y que esto no puede ser considerado como un aporte inventivo, es indiscutible que la materia reclamada es anticipada por las anterioridades citadas. El mejoramiento de una inserción sin asocio a un aporte extraordinario no puede entenderse como inventivo, además de que la determinación de secuencias de unión de genes objetivo conocidos, como los de resistencia a insectos, se constituye como una práctica normal en el estado de la técnica.

Para un técnico versado en la materia, conociendo el origen de la inserción y el gen exógeno insertado es posible determinar cebadores y secuencias de unión que mejoren la inserción, inclusive sin conocerlas podría determinarlas, definir cebadores para las mismas y posteriormente detectarlas; la aplicación de técnicas conocidas a eventos puntuales no las hace inventivas.

De esta manera, el hecho de que los documentos citados no especifiquen la secuencia del evento MON 15985, a la luz de que son las secuencias de unión y no la inserción como tal el núcleo de la invención y que las secuencias de genes de resistencia a insectos y su inserción son de dominio y conocimiento de un técnico versado en la materia el aporte o mejoramiento de un evento anterior no puede considerarse inventivo.

En conclusión, todos los documentos solos o en combinación, junto con los

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN 10603
Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT 02 049630

conocimientos de un técnico versado en la materia destruyen el nivel inventivo del capítulo reivindicatorio solicitado.

Por lo anteriormente expuesto se reitera que el objeto de la solicitud en estudio no cumple con los requisitos de patentabilidad; en consecuencia no se halla mérito para revocar la decisión impugnada.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Confirmar la decisión contenida en la Resolución 41832 del 13 de diciembre de 2007, por medio de la cual se negó una patente de invención.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución a la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC, o a quien haga sus veces, el contenido de la presente resolución, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella no procede recurso alguno por encontrarse agotada la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dada en Bogotá D.C., a los 28 MAYO 2008

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO.

GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Calle 94 Nº 7A-09
Bogotá D. C.

202066
rc

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
EL SECRETARIO GENERAL
Certifica que la Resolución 16488 de fecha 28/05/2008
fué notificado mediante listado número 92
fijado el 09/06/2008 y desfijado el 20/06/2008

407
400

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LA SECRETARIA GENERAL AD- HOC

CERTIFICA

PRIMERO: QUE LA RESOLUCIÓN Nº 41832 DEL 13 DE DICIEMBRE DE 2007, PROFERIDA DENTRO DEL EXPEDIENTE Nº 02049630, "POR LA CUAL SE NIEGA UNA PATENTE DE INVENCIÓN", FUE NOTIFICADA A LA DOCTORA MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, MEDIANTE LISTADO Nº 38 FIJADO EL 26 DE DICIEMBRE DE 2007 Y DESFIJADO EL 10 DE ENERO DE 2008.

SEGUNDO: QUE LA RESOLUCIÓN Nº 16488 DEL 28 DE MAYO DE 2008, "POR LA CUAL SE RESUELVE UN RECURSO DE REPOSICIÓN", CONFIRMÓ LA RESOLUCIÓN Nº 41832 DEL 13 DE DICIEMBRE DE 2007, Y FUE NOTIFICADA A LA DOCTORA MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, MEDIANTE LISTADO Nº 92 FIJADO EL 9 DE JUNIO DE 2008 Y DESFIJADO EL 20 DE JUNIO DE 2008.

TERCERO: QUE EN CONSECUENCIA LAS RESOLUCIONES Nº 41832 DEL 13 DE DICIEMBRE DE 2007 Y 16488 DEL 28 DE MAYO DE 2008, QUEDARON DEBIDAMENTE EJECUTORIADAS EL 20 DE JUNIO DE 2008.

SE EXPIDE EN BOGOTÁ D. C., AL CUARTO (4) DÍA DEL MES DE NOVIEMBRE DE DOS MIL OCHO (2008), A SOLICITUD DEL INTERESADO.

ORIGINAL FIRMADO Julia Balaustre Pérez

JULIA BALAUSTRE PÉREZ

PABS

04-11-08

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 PBX: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20 – 382 26 95. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

Royal Technologies S.A.

Registros encontrados: 11

RADICADO ANTERIOR	CARPETA	AÑO	NUEVO RADICADO	CONTROL	CONSECUTIVO	FECHA	BLOQ
01032978-00-00-00	01032978	01	032978	--	00000	2001-04-27 00:00:00	
01032978-00-00-00	01032978	01	032978	--	00001	2001-04-27 16:20:56	
01032978-00-00-01	01032978	01	032978	--	00002	2001-05-24 14:39:12	
01032978-00-00-02	01032978	01	032978	--	00003	2001-07-09 16:39:03	
01032978-00-00-03	01032978	01	032978	--	00004	2001-08-16 17:30:17	
01032978-00-00-04	01032978	01	032978	--	00005	2002-01-31 15:52:28	
01032978-00-00-05	01032978	01	032978	--	00006	2002-02-28 19:34:53	
01032978-00-00-06	01032978	01	032978	--	00007	2002-03-20 17:55:17	
01032978-00-00-07	01032978	01	032978	--	00008	2002-03-27 18:00:11	
01032978-00-01-00	01032978	01	032978	--	00009	2002-04-03 10:21:00	
01032978-00-00-08	01032978	01	032978	--	00010	2002-04-03 23:05:02	

2008-0378

403
402

CASTELLANOS & CO
Abogados en Propiedad Intelectual
Calle 94 A No. 7 A – 09
Bogotá, D.C.
Colombia

Señores
HONORABLES CONSEJEROS
Sección Segunda
Consejo de Estado

Acción de nulidad y restablecimiento del derecho en contra de las Resoluciones 41832 del 13 de diciembre de 2007 y 16488 del 28 de mayo de 2008, proferidas por el Superintendente de Industria y Comercio, mediante las cuales se negó el privilegio de patente a la creación denominada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo" y se confirmó tal decisión al ser resuelto el recurso de reposición.

Demandante: MONSANTO TECHNOLOGY LLC
Demandado: LA NACIÓN, SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Margarita Castellanos Abondano, mayor de edad, identificado como aparece al pie de mi firma, actuando en nombre de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC en el asunto de la referencia, presento acción de nulidad y restablecimiento del derecho, en contra de las resoluciones 41832 del 13 de diciembre de 2007 y 16488 del 28 de mayo de 2008, proferidas por el Superintendente de Industria y Comercio, mediante las cuales se negó el privilegio de patente a la creación denominada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo" y se confirmó tal decisión al ser resuelto el recurso de reposición.

PETICIÓN INICIAL

Manifiesto bajo la gravedad de juramento que a pesar de que mediante memorial radicado el día 14 de octubre de 2008 solicité a la Superintendencia de Industria y Comercio la expedición de copias auténticas de las resoluciones cuya anulación se reclama, dicha entidad no me las ha entregado aún. En consecuencia, respetuosamente solicito a su Despacho que oficie a dicha entidad para que expida y envíe a su Despacho tales Resoluciones.

OPORTUNIDAD PROCESAL Y PRESUPUESTOS PROCESALES

Cumplo los presupuestos procesales previstos en los Títulos XIV y XV del Código de lo Contencioso Administrativo así:

Competencia y Cuantía:

20
6
404
403

La demanda se dirige al Honorable Consejo de Estado para que asuma el conocimiento en única instancia, entidad competente, según se determina a continuación (C.C.A. Art. 128 numerales 3 y 14):

a. Por razón de la naturaleza de los actos demandados (relativos a la propiedad industrial).
b. Por tratarse de un restablecimiento del derecho que carece de cuantía.

Agotamiento de la Vía Gubernativa:

La vía gubernativa está agotada por haberse resuelto el recurso de reposición instaurado por la Sociedad actora ante el Superintendente de Industria y Comercio, y no proceder ningún otro recurso administrativo según lo dispuesto en los artículos 50, 62, 63 y 135 del Código de lo Contencioso Administrativo.

Oportunidad:

De acuerdo con lo establecido en el numeral 2 del artículo 136 del código Contencioso Administrativo, la demanda de nulidad y restablecimiento del derecho caduca al cabo de 4 meses "contados a partir del día siguiente al de la publicación, notificación, comunicación o ejecución del acto, según el caso."

La Resolución No.16488 del 28 de mayo de 2008 fue notificada por edicto fijado el 9 de junio de 2008 y desfijado el 20 de junio de 2008. En consecuencia, el término para presentar la demanda de nulidad y restablecimiento del derecho se vence el 20 de octubre de 2008. En consecuencia, esta demanda esta siendo presentada en tiempo.

PARTES

1. La parte demandante en este proceso es la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC, representada legalmente por la suscrita y domiciliada en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos de América

2. La parte demanda es la Nación – Superintendencia de Industria Comercio (en adelante SIC), representada legalmente por el Señor Superintendente de Industria y Comercio, Doctor Gustavo Valbuena Quiñones, o quien haga sus veces y domiciliada en la carrera 13 No. 27-00, de Bogotá D.C., Colombia.

PETICIONES

Respetuosamente solicito a los Honorables Consejeros:

1. Que declaren la nulidad de la Resolución 41832 del 13 de diciembre de 2007, proferida dentro del expediente No. 02.049.630, por el Superintendente de Industria y Comercio.

17
409

2. Que declaren la nulidad de la Resolución No. 16488 del 28 de mayo de 2008, proferida dentro del expediente No. 02.049.630, por el Superintendente de Industria y Comercio.

3. A título de RESTABLECIMIENTO DEL DERECHO solicito a los Honorables Consejeros que ordenen la concesión del privilegio de patente a la creacción llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo", a favor de la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

4. Solicito también a los Honorables Consejeros que ordenen la PUBLICACIÓN de esta sentencia en la Gaceta de la Propiedad Industrial.

HECHOS

1. El día 11 de junio de 2002 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC solicitó ante la entidad demandada que se concediera el privilegio de patente a la invención llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo". Se trataba de la fase nacional de una solicitud PCT.

2. El día 14 de junio de 2002 se presentó la traducción oficial al español de la solicitud anterior.

3. El 11 de julio de 2002 y con ocasión del examen de forma de la solicitud, la entidad demanda requirió a la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC para que: i) hiciera constar la cesión del derecho a la patente otorgada por los inventores al solicitante; ii) presentara la traducción de la patente.

4. El 15 de agosto de 2002 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC dio oportuna y completa respuesta al oficio anterior, presentando el documento de cesión otorgado por los inventores al solicitante y aclarando que la traducción de la invención fue presentada el 14 de junio de 2002. Igualmente, con dicho auto se presentó copia certificada de la solicitud de patente estadounidense 06/297,406 del 11 de junio de 2001, junto con su traducción, en la cual se basa la reivindicación de la prioridad.

5. Tras confirmar que la solicitud cumplía con todos los requisitos de forma, el día 26 de diciembre de 2003 la entidad demandada ordenó su publicación. Esta publicación fue efectuada en la Gaceta de la Propiedad Industrial No. 537 del 27 de febrero de 2004.

6. Ningún tercero presentó oposiciones en contra de la solicitud de concesión del privilegio de patente llamado "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo".

7. El día 17 de agosto de 2004, la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC solicitó a la entidad demandada que efectuara el correspondiente examen de patentabilidad y canceló las tasas oficiales correspondientes.

17

405 406

8. El 24 de mayo de 2006, la entidad demanda expidió el oficio No. 5591, presentando objeciones a la solicitud de patente presentada, relacionadas con su claridad (alegando que algunas de las expresiones usadas en algunas reivindicaciones, las hacen vagas e imprecisas) y alegando que otras reivindicaciones no pueden ser objeto de patente, por tratarse de procedimientos esencialmente biológicos. 1er Art. 45

9. El día 24 de agosto de 2006 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC solicitó a la entidad demanda que le concediera un plazo adicional para contestar al anterior oficio, pagando las tasas oficiales correspondientes.

10. El 4 de octubre de 2006 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC respondió al oficio 5591, presentando un nuevo capítulo reivindicatorio y explicando las razones por las cuales la solicitud es suficientemente clara y que no se reivindican procesos esencialmente biológicos.

11. El día 2 de noviembre de 2006 la entidad demandada expidió el oficio No. 12665, estableciendo que como resultado de la búsqueda de anterioridades se encontró que la solicitud en estudio corresponde a la solicitud europea publicada con el NO. WO02100163 y que del análisis del examen de la solicitud extranjera se estableció que tales documentos afectaban la patentabilidad del objeto de la solicitud. En vista de lo anterior, solicitó a la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC que presentara copia de tales documentos y los argumentos que considerara necesarios en defensa de su solicitud. Art. 46

12. El día 1 de febrero de 2007 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC dio respuesta al oficio 12665, presentando copia de los documentos y explicando las razones por las cuales tales documentos no afectaban la patentabilidad de la invención llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo"

13. El día 1 de marzo de 2007 la entidad demandada expidió el Oficio No. 2757, indicando: a) Que las reivindicaciones 1, 4, 9-11 y 16 no cumplen con el requisito de claridad definido en el artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. b) Que tampoco se cumple con el requisito de Unidad de Invención. c) que la reivindicación 7 no puede considerarse una invención por hacer referencia a procesos esencialmente biológicos que pueden presentarse espontáneamente sin la intervención humana. d) que la reivindicación 8 reclama secuencias de ADN aisladas, que constituirían materia existente en la naturaleza, no modificada por el hombre y por ende que no puede ser considerada invención a la luz del literal b) del artículo 15 de la Decisión 486. e) Que se encontraron documentos dentro del estado de la técnica que pueden afectar el nivel inventivo de la solicitud. 2do Art. 45

14. El día 28 de mayo de 2007 la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC solicitó a la entidad demandada que le concediera un plazo de 30 días para atender el oficio 2757, notificado por fijación en lista el 1 de marzo de 2007.

15. El día 12 de julio de 2007 se dio oportuna y completa respuesta al oficio 2757 del 1 de marzo de 2007.

16. El día 18 de octubre de 2007 presenté ante la entidad demandada el documento de poder que me concedió la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC y que me permitió continuar con el trámite de la solicitud de la patente PCT entrada en fase nacional para el invento llamado "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo".

17. El día 13 de diciembre de 2007 la entidad demandada expidió la Resolución No. 41832, mediante la cual decidió negar el privilegio de patente a la invención llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo", alegando: a) Que la solicitud no es un invento, en tanto reivindica procesos biológicos naturales. B) Que algunas de las reivindicaciones aún no cumplen con el requisito de claridad establecido en el artículo 30 de la Decisión 486. C) Que la invención tampoco cumple con el requisito de unidad de invención. D) Que la invención carece de nivel inventivo.

18. El día 17 de enero de 2008 presenté recurso de reposición en contra de la Resolución No. 41832 del 13 de diciembre de 2007.

19. El día 28 de mayo de 2008, el Superintendente de Industria y Comercio resolvió el recurso de reposición interpuesto, confirmando la negación del privilegio de patente a la invención llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo"

NORMAS VIOLADAS

Con la expedición de las Resoluciones 41832 del 13 de diciembre de 2007 y 16488 del 28 de mayo de 2008, la entidad demandada violó por indebida interpretación, las siguientes normas:

1. Artículo 15, literal b), de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina:

   "No se considerarán invenciones:

   "b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural

2. Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina:

   "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica."

3. Artículo 25 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina:

"La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo."

4. Artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina:

"Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

"Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

FUNDAMENTOS DE LA VIOLACIÓN DEL LITERABL B) DEL ARTÍCULO 15 DE LA DECISIÓN 486 DE LA COMISIÓN DE LA COMUNIDAD ANDINA

La Resoluciones demandadas establecen que la reivindicación 7 de la solicitud no se considera una invención bajo el Artículo 15 de la Decisión 486 puesto que involucra un proceso natural y biológico ya que su ejecución corresponde específicamente al proceso de reproducción natural y que, aún cuando es inducido por el hombre, un evento se produce con o sin la participación humana.

Pues bien, la reivindicación 7 se refiere a un método para producir una planta de algodón por el cruzamiento de una planta que comprende SEQ ID NOs:14-18 con una planta de algodón diferente, para obtener al menos una progenie y seleccionar entre progenie aquellas plantas que sean resistentes a insectos y comprendan SEQ ID NOs:14-18. El proceso reivindicado no puede y de hecho no se produce de forma natural por las razones presentadas en el recurso de reposición presentado en contra de la resolución No. 41832 y que se reiteran más adelante en la presente demanda.

En primer lugar, el algodón tiene un sistema de polinización cerrado; sin la intervención humana, no es posible producir plantas transgénicas endógenas ni híbridos. Esto significa que la intervención humana es absolutamente necesaria para el paso de cruzamiento (a) de la reivindicación 7, y dicho paso no es un paso biológico natural como se aduce en las Resoluciones demandadas.

En segundo lugar, la reivindicación 7 incluye además un paso para seleccionar la progenie que comprende secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N°:14-18, y que son secuencias nuevas de ADN de unión transgénico-genómica a causa de la inserción del transgen. Esta etapa requiere ciertamente de la intervención técnica del hombre ya que no todas las plantas de la progenie tendrían la inserción de MON15985 de la presente invención y se requiere un paso de análisis para identificar las plantas de la progenie que tienen la inserción de MON15985.

OK, paso c) requiere intervención humana.

Pero seleccionar no implica un paso o metodología técnica.

w3 comunidadandina.org
Documentos / Procesos Tribunal Andino.

Aparentemente la Superintendencia de Industria y Comercio basa su decisión solamente en la palabra "cruzamiento" del paso (a). En el presente caso, el cruzamiento de una planta transgénica con una planta de algodón diferente (que podría ser una planta no transgénica) no tiene lugar en forma natural, porque las plantas de algodón tienen un sistema de polinización cerrado y como tal, la intervención humana siempre debería existir para que esto suceda.

Además, la Superintendencia de Industria y Comercio ignora el paso de selección (c) que requiere que un técnico realice algún tipo de análisis y rastreo.

De otro lado, no le asiste razón a la entidad demanda cuando afirma que aún si es inducido por el hombre, un evento tiene lugar con o sin la participación humana, por cuanto los versados en el arte de la ingeniería genética de plantas saben que un evento de transgénico o de transformación no sucede en forma natural y que la intervención humana es absolutamente necesaria para que éste se produzca.

En efecto, en la memoria de esta solicitud se incluye una definición de evento transgénico, que dice lo siguiente:

> *"Como se utiliza aquí, un "evento" transgénico se refiere a una planta recombinante producida mediante la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgen de interés, regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgen dentro del genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización del genoma particular. El término "evento" se refiere al transformante y la progenie originales del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida mediante cruce sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Aún después de repetido el retrocruzamiento de un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN de flanqueo proveniente del padre transformado está presente en la progenie del cruce, lo mismo que el sitio del cromosoma. El término "evento" también se refiere al ADN proveniente del transformante original que comprende el ADN inserto y la secuencia de flanqueo inmediatamente adyacente al ADN inserto que se esperaría fuera transferida a la progenie que recibe el ADN inserto incluyendo el transgen de interés como resultado del cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo el transformante y la progenie originales que resultan de sí mismas) y las líneas parentales que no contienen el ADN insertado.* (*subrayado fuera de texto*)

Queda claro que una planta recombinante/transformante y su progenie o el ADN del transformante que comprende el ADN insertado y sus secuencias de flanqueo inmediatamente adyacente al ADN insertado no existen naturalmente, sino que se producen a través de la intervención humana.

En conclusión, es claro que la reivindicación 7 no se refiere a un proceso biológico natural y por lo tanto sí debe considerarse como una invención.

FUNDAMENTOS DE LA VIOLACIÓN DEL ARTÍCULO 30 DE LA DECISIÓN 486 DE LA COMISIÓN DE LA COMUNIDAD ANDINA

La Superintendencia de Industria y Comercio establece en las resoluciones demandadas que en la solicitud se utilizan términos ambiguos tales como "al menos" y "una porción de" que, para la definición clara y concisa de la invención carecen de veracidad.

Pues bien, tal como quedó demostrado en los recursos presentados y en los diferentes escritos con los que se contestó a los estudios de fondo efectuados por la entidad demandada, los términos "al menos" y "una porción de" cuando se hace referencia a una sonda o un cebador que es específico para detectar el inserto MON15985 no resultan ambiguos para un especialista en la materia, y que dichos términos se utilizan rutinariamente cuando se describen las sondas o cebadores. Sería una limitación injusta si las reivindicaciones se limitaran a una secuencia precisa. Además, como las reivindicaciones 9 y 10 dependen de la reivindicación 8, que indica al menos quince nucleótidos, la definición de "una porción de" en las reivindicaciones 9 y 10 sugiere claramente que las moléculas aisladas de ADN de las reivindicaciones 9 y 10 tienen una longitud de por lo menos quince nucleótidos.

Además, las sondas/cebadores de las reivindicaciones 8-10 y el kit de detección de ADN de la reivindicación 16 derivan de las secuencias de unión o amplicones que son exclusivas de la inserción de MON15985. Dicho evento de inserción incluye modificaciones genéticas y no se produce naturalmente. De este modo, las moléculas de ADN descritas en las reivindicaciones 8-10 y 16 no existen de manera espontánea en la naturaleza. Por otra parte en búsquedas de arte previo conducidas en todo el mundo en las solicitudes correspondientes se reveló que no existen secuencias preexistentes que podrían quedar incluidas en las reivindicaciones 8-10.

En vista de lo precedente, los términos utilizados en las reivindicaciones 8-10 y 16 no son ambiguos y son absolutamente claros para los versados en el arte.

En la Resolución 16488 del 28 de mayo de 2008 se establece que los términos como "al menos" y "una porción de" podrían ser de uso habitual para un técnico versado en la materia pero que carecen de veracidad en la definición clara y concisa de un desarrollo.

Manifiesto mi desacuerdo frente a esta posición de la Superintendencia de Industria y Comercio puesto que la terminología empleada en una solicitud de patente debe ser "clara y concisa" para que un técnico medio pueda ejecutar la invención reivindicada. Entonces, además de los argumentos anteriores, resalto lo indicado por el Manual Andino de Patentes en cuanto a la claridad e interpretación de las reivindicaciones:

> *"El significado y alcance de las palabras de las reivindicaciones deber ser el que normalmente se les da en el área técnica de la solicitud, y tiene que ser claro para la persona versada en la materia con la sola lectura de las reivindicaciones..."*[1] (Subrayado fuera de texto).

[1] Manual Andino de Patentes, Numeral 4.6.1, página 39.

27
13
411
410

En vista de lo anterior, contrario a lo expuesto en la Resolución **16488 del 28 de mayo de 2008**, los términos empleados y que son de uso común en el campo técnico de la solicitud sí son claros y concisos y no carecen de veracidad en la definición de la invención.

FUNDAMENTOS DE LA VIOLACIÓN DEL ARTÍCULO 25 DE LA DECISIÓN 486 DE LA COMISIÓN DE LA COMUNIDAD ANDINA

En la Resolución **16488 del 28 de mayo de 2008**, la entidad demandada sostiene su posición al alegar que:

(a) las secuencias reivindicadas están "presentes en todos los eventos" y "corresponderían más apropiadamente de manera exacta a una secuencia única, que no es reclamada como tal en ninguna parte";

(b) dado que el amplicón incluye secuencias de unión, "por ello serían consistentes con una construcción específica de secuencia única";

(c) las secuencias reivindicadas "se entienden como independientes presentes, ausentes o en combinación en el evento y que al diferir estructuralmente originan diferentes inserciones"; y

(d) la "definición de diferentes secuencias como características del evento implicaría el reclamo de desarrollos independientes".

En primer lugar, pareciera que la Superintendencia de Industria y Comercio interpretó mal o no comprendió la presente invención. Nuevamente, expongo que la invención está dirigida a la inserción MON15985, que se caracteriza por las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, o por las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12. Las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 están ligadas físicamente de tal manera que la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, es un diagnóstico de la presencia de cada una de las otras secuencias también. Es decir, la célula vegetal resistente a insectos reivindicada comprende una inserción Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, estando dicho objeto claramente reflejado en la reivindicación dependiente 2.

En segundo lugar, con los siguientes argumentos se demuestra la errada interpretación efectuada por la entidad demanda que le llevó a concluir que la solicitud carecía de unidad inventiva:

Las secuencias de unión reivindicadas corresponden específicamente a la inserción particular MON15985 contenida en PTA-2516. Los eventos que no contienen a la inserción MON15985 no contienen a la combinación de las SEQ ID N°:14-18 que define específicamente a la inserción MON15985. Es decir, las secuencias reivindicadas no están presentes en todos los eventos como alega la Superintendencia de Industria y Comercio en (a), mencionado antes. Un técnico versado en la materia comprendería rápidamente que las secuencias de unión son el resultado de la inserción de una secuencia de ADN heteróloga en el genoma de una planta. Es decir, la naturaleza de las secuencias de unión varía según la ubicación en el genoma de la planta en donde se inserta la secuencia de ADN transgénica/recombinante. Solamente un sitio de inserción particular de la secuencia codificante de Cry2Ab conduce a la existencia de la combinación de las SEQ ID N°:14-18, y a dicha inserción particular se la refiere como el evento de

inserción MON15985. Ninguna otra inserción llevaría a la existencia de la combinación de las SEQ ID N°:14-18, ni tampoco ninguna otra inserción independiente de las secuencias codificantes de Cry2Ab en el genoma de la célula de algodón que diera como resultado la inserción de estas secuencias en la misma posición en el genoma de células de algodón. El evento molecular fundamental que ha dado lugar al evento de inserción MON15985 está caracterizado de manera completa en la memoria descriptiva presentada y en las reivindicaciones presentadas.

El proceso de insertar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab en el genoma de plantas de algodón dio como resultado la formación del genoma que ahora comprende al evento transgénico de algodón MON15985, y este "evento" de inserción dio como resultado la formación de cinco secuencias de unión únicas, ligadas genéticamente. Es decir, la célula vegetal reivindicada contiene una sola secuencia de nucleótidos que incluye una inserción de ADN que codifica Cry2Ab Y cinco secuencias de unión únicas, ligadas. La detección de cualquiera o de cualquier combinación de estas cinco secuencias únicas en una muestra que comprende ADN de plantas de algodón es diagnóstico de la presencia del evento MON15985 en la muestra. La Superintendencia de Industria y Comercio alega en (a), mencionado precedentemente, que las secuencias reivindicadas "más bien corresponderían exactamente a una secuencia única". El significado correcto de la mencionada "secuencia exacta" sería una sola secuencia que incluye una inserción de ADN que codifica Cry2Ab Y cinco secuencias de unión únicas, ligadas, en lugar de cada una de las cinco secuencias de unión por separado como aparentemente alega la Superintendencia.

Una célula vegetal que contiene una inserción Cry2Ab en un sitio diferente dentro de su genoma no estaría cubierta por la presente reivindicación porque dicha célula vegetal no iba a contener las secuencias de unión reivindicadas. Hay una unión única entre el sitio de inserción particular de la inserción Cry2Ab y la existencia de las cinco secuencias de unión. Por otro lado, la célula vegetal de algodón que solamente contiene las cinco secuencias de unión sin una inserción Cry2Ab no estaría dentro del alcance de las reivindicaciones. Esto significa que la naturaleza de las secuencias de unión identificadas en la reivindicación 2 define claramente la unión entre la inserción Cry2Ab y las secuencias de unión y que la célula vegetal reivindicada no comprende de manera independiente Cry2Ab y las secuencias de unión reivindicadas.

La Resolución 16488 establece que dado que el amplicón incluye secuencias de unión, "sería entonces consistente con una construcción específica de una secuencia única" ((b) antes mencionado). Como se mencionara antes, la supuesta "secuencia única" que identifica/define a la inserción MON15985 debería ser una sola secuencia que incluye una inserción de ADN que codifica Cry2Ab Y cinco secuencias de unión únicas, ligadas, en lugar de cada una de las cinco secuencias de unión por separado como aparentemente alega la Resolución.

Como se ha explicado anteriormente en el trámite de la solicitud, las secuencias del amplicón de la SEQ ID N°:11 y de la SEQ ID N°:12 muestran los extremos 5' y 3', respectivamente, de la inserción en el evento de algodón MON15985 o MON15985X y además incluyen el ADN que flanquea inmediatamente la inserción por ambos extremos. La SEQ ID N°:11 comprende las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-16, en tanto la SEQ ID N°:12 comprende las secuencias de unión de las SEQ ID N°:17-18 (ver Fig. 1 adjunta). Es decir, las secuencias del amplicón forman de hecho parte de la "secuencia única" insertada en el genoma vegetal de

algodón, que identifica/define a la inserción MON15985 como se describió precedentemente.

La Superintendencia de Industria y Comercio alega en (c), que las secuencias reivindicadas "se entienden como independientes presentes, ausentes o en combinación en el evento, y que al diferir estructuralmente originan diferentes inserciones". Como se describiera previamente, respetuosamente manifiesto que dicha alegación es falsa, porque las cinco secuencias de unión NO existen de forma independiente; en su lugar, existen como una unidad/paquete en la inserción particular MON15985. Las cinco secuencias de unión NO son originarias de diferentes inserciones. Como se describiera previamente, solamente un sitio particular de inserción de la secuencia codificante de Cry2Ab conduce a la existencia de la combinación de las SEQ ID N°:14-18, y dicha inserción particular es la inserción MON15985. Ninguna otra inserción conduciría a la existencia de la combinación de las SEQ ID N°:14-18.

Por último, la Superintendencia de Industria y Comercio aduce en (d), que se menciona previamente, que la "definición de diferentes secuencias como características del evento implica el reclamo de desarrollos independientes". No se comprende de qué manera la Superintendencia puede llegar a la conclusión que las secuencias reivindicadas en realidad reivindican "desarrollos independientes". Claramente, como se describiera previamente, las cinco secuencias de unión y las dos secuencias de amplicones son originarias todas de un evento de inserción particular, que es el evento de inserción MON15985. Es tan solo "un desarrollo", porque todas las secuencias reivindicadas están ligadas físicamente y son inseparables, y es el resultado del mismo evento de inserción particular.

En conclusión, la célula vegetal transgénica reivindicada comprende una inserción Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 (véase la reivindicación dependiente 2) o comprende una inserción Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12 (véase la reivindicación dependiente 3). Una célula que comprende una inserción que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:14-18 (secuencias de unión) incluye una célula que comprende una inserción que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:11-12 (secuencias de amplicones).

Las SEQ ID N°:14, 15, 16, 17 y 18 son secuencias de unión y las SEQ ID N°:11 y 12 son secuencias de amplicones que son únicas para la inserción MON15985. Entonces, afirmo que en la solicitud hay una sola invención: el evento de algodón MON15985 que contiene un grupo selecto de marcadores (es decir, las secuencias de unión o de amplicones) como resultado de la inserción del ADN transgénico en el genoma. La detección de cualquiera de estos marcadores en una muestra conocida por provenir de semillas de algodón o de otro tejido de algodón es diagnóstico de la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra. Todas las secuencias están ligadas físicamente, donde la detección de cualquiera de estas secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, también la presencia de cada una de las otras secuencias. Como tales, las cinco secuencias de unión o las dos secuencias de amplicones co-existen en la planta transgénica reivindicada y deberían examinarse juntas como una sola invención. Es decir, las reivindicaciones de la presente no carecen de Unidad de invención.

413

FUNDAMENTOS DE LA VIOLACIÓN DEL ARTÍCULO 18 DE LA DECISIÓN 486 DE LA COMISIÓN DE LA COMUNIDAD ANDINA

En las resoluciones demandadas se confirma el rechazo de nivel inventivo de la solicitud en vista de los documentos D1 a D7 citados en tales decisiones.

Determinación del Estado de la Técnica

Considero que el estado de la técnica determinado por el señor Examinador no cumple con los requisitos necesarios para ser considerados como anterioridades válidas a la invención de la presente solicitud. Lo anterior, toda vez que según el artículo 16 de la Decisión 486:

> *"Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica.*
> *El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.*
> *Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40."*

De la lectura de éste artículo, se puede concluir que la Superintendencia de Industria y comercio violó las disposiciones del mismo porque no estableció claramente la fecha de publicación de las anterioridades D1 a D4, que permitan determinarlas como válidas para el estudio de patentabilidad de la invención reivindicada por mi representada. La fecha de publicación impresa de los documentos mencionados es 15 de junio de 2001, esto es, posterior a la fecha de prioridad de la solicitud 11 de junio de 2001. Por otra parte informo a ese Despacho que la distribución de información y de semillas de acuerdo con la invención se hizo a varios institutos para ensayos de campo bajo un acuerdo de confidencialidad entre las partes. Como referencia, adjunto la declaración Juramentada presentada por el solicitante MONSANTO TECHNOLOGY LLC ante la Oficina de Patentes de los Estados Unidos con el objeto de probar que la invención no era conocida antes de la fecha de prioridad y que la materia objeto fue suministrada a las personas que divulgaron información en la conferencia de Beltwide bajo términos de confidencialidad y con restricciones sobre publicación, uso, venta, etc.

Aún cuando las objeciones basadas en las enseñanzas de D1 a D4 son improcedentes en el estudio de patentabilidad de la presente invención, a continuación presento los argumentos que desvirtúan las afirmaciones de la Superintendencia de Industria y comercio sobre el nivel inventivo de la solicitud.

D1 (Adamczyk), D2 (Akin), D3 (Norman) y D4 (Jackson) son presentaciones hechas ante la Beltwide Cotton Conference. Estas referencias simplemente mencionan los términos BollgardII®, DP50BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX sin hacer divulgación alguna sobre las secuencias de diagnóstico que son únicas

para el(los) evento(s) mencionado(s). Los términos anteriores son términos puramente arbitrarios carentes de cualquier característica técnica.

Además, en D1 a D4 se evalúan estudios de campo entre DPL50, DPL50B, MON15985 y otros, sin divulgar caracterizaciones de los efectos transgénicos a los cuales se hace referencia, y todo lo que se divulga en los mismos son comparaciones de actividad insecticida entre diversas líneas de algodón.

D5 (Stewart) divulga el impacto de algodón que expresa una o dos endotoxinas de *B. thuringiensis* sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de Lepidoptera. En esta referencia se citan dos eventos que expresan Cry2Ab y Cry1Ac, MON15985, y MON15813. Estos eventos son idénticos excepto con referencia a la caracterización molecular del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Aunque se menciona que MON15985 es uno de los cultivares primarios usados en sus ensayos, en D5 no se revela ninguna secuencia que permita diagnosticar la inserción MON15985. Es decir, que D5 no contiene divulgación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

D6 (Windels) divulga un método de PCR para detectar el ADN de soja RoundUp Ready™ en una forma específica de la línea. En D6 no se enseña ni sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que incluya las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12. Sin contener una descripción de las características técnicas específicas mencionadas precedentemente acerca de la inserción MON15985, D6, aunque provea un método de PCR para detectar una línea específica de organismos genéticamente modificados (GMO), no provee una motivación para un método de detección del evento de inserción en algodón como se revindica en la solicitud.

D7 (WO 00/26371) divulga un método para expresar la δ-endotoxina Cry2A localizada en un organela o compartimiento subcelular en plantas y plantas que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica una δ-endotoxina Cry2A. Aunque divulga la co-expresión de Cry2Ab y otra δ-endotoxina Cry *B.* de *thuringiensis*, D7 no divulga el evento MON15985 ni secuencia alguna que diagnostique la inserción MON15985. Es decir, no se provee en D7 divulgación alguna sobre las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12.

En cuanto a requisitos de patentabilidad, el solicitante argumenta que la solicitud es novedosa toda vez que sin el conocimiento de las secuencias estructurales de diagnóstico del evento MON15985, un técnico versado en la materia no sabría cómo identificar o detectar dicho evento. La única información divulgada por la técnica anterior, incluyendo las referencias citadas D1-D7, para el versado en la materia era que el evento MON15985 y el evento MON15813 expresaban dos proteínas insecticidas diferentes, Cry2Ab y Cry1Ac.

Esta información por sí sola no provee al versado en la materia un conocimiento de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas. No se reveló información alguna sobre la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab ni tampoco la posición relativa del gen que codifica la proteína Cry2Ab. Como no se conocían las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína Cry2Ab, se carecía del conocimiento técnico suficiente sobre el evento MON15985 para que el técnico versado en la técnica pudiera identificar las secuencias reivindicadas y no se

415-18
416

Anterioridades no divulgan SEQ de Mon 15985.

hubieran podido identificar sin la divulgación de la presente invención. Considerando que el evento MON15985 y el evento MON15813 son idénticos con respecto a la expresión de la proteína Cry2Ab en células de algodón, salvo por la posición del ADN codificante de la proteína Cry2Ab insertado dentro del genoma de algodón, la persona versada en la técnica no podría distinguir un evento del otro sin las enseñanzas de la presente invención. El conocimiento técnico acerca de un evento que expresa una proteína particular no se traduce en conocimiento técnico acerca de otro evento que expresa la misma proteína. Cada evento es único y está caracterizado por secuencias de diagnóstico únicas. Por lo tanto, las secuencias de diagnóstico únicas (secuencias de unión o de amplicones) reivindicadas en la presente invención no están divulgadas en la técnica.

Las secuencias de unión reivindicadas son únicas y específicas para la inserción MON15985. Estas secuencias son específicas para el sitio de inserción particular del vector de integración de Cry2Ab. Dado que tanto el evento MON15985 como el evento MON15813 son idénticos con respecto a la proteína Cry2Ab expresada a partir del ADN insertado en el genoma de algodón, pero diferente con respecto a la *posición* del ADN insertado que codifica a la proteína Cry2Ab dentro del genoma de algodón, no sería razonable para un técnico versado en la materia suponer que ambos eventos pudieran contener las mismas secuencias de unión transgénicas-genómicas. Aún así, solamente con la divulgación de la presente invención sería posible para un técnico versado en la materia comprender que solamente el evento MON15985 contiene a las secuencias de unión reivindicadas.

La mera mención del término MON15985 no constituye "un conocimiento técnico" de la materia suficiente como para deducir la presente invención. Además, cada evento transgénico es único, que comprende secuencias de unión o de amplicones únicos suficientes como para caracterizar el evento. La presente invención divulga, por primera vez, las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 así como las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12 que comprenden las secuencias de unión que se muestran en las SEQ ID N°:14-18 que son únicas para el evento MON15985 y, por ello, provee la capacidad, por primera vez, de detectar específicamente el evento de MON15985 particular en una muestra de algodón. Ninguno de los documentos D1-D7, ya sea solo o combinado, provee "el conocimiento técnico" del evento MON15985, mucho menos la capacidad para detectar específicamente dicho evento en una muestra de algodón.

Según se argumentara previamente como respuesta a la Resolución Denegatoria y como se destaca en la presente demanda, la simple referencia a MON15985 o la divulgación de la co-expresión de Cry2Ab con otra endotoxina en D1-D7 no le quita actividad inventiva a la presente invención reivindicada porque: (1) la mera referencia del evento MON15985 es puramente arbitraria y carece de todo significado técnico. Sin ninguna divulgación de las características estructurales únicas que se puedan usar para identificar el evento MON15985, un técnico versado en la materia en la técnica no podría practicar las reivindicaciones de la presente invención. La mera mención del término MON15985 no constituye "el conocimiento técnico" de la materia suficiente como para deducir la presente invención; y (2) cada evento transgénico es único, que comprende secuencias de unión o de amplicones únicas suficientes como para caracterizar el evento. La presente invención divulga, por primera vez, las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 así como las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12 que comprenden las secuencias de unión que se muestran en las SEQ ID N°:14-18 que son únicas para el evento MON15985 y, por ello, proveen la capacidad, por

primera vez, de detectar específicamente el evento MON15985 particular en una muestra de algodón. Ninguno de los documentos D1-D7, solos o combinados, provee "el conocimiento técnico" del evento MON15985, mucho menos la capacidad para detectar específicamente dicho evento en una muestra de algodón.

Además, dado que cada evento transgénico es único, un método usado para detectar una línea específica de GMO como se divulga en D6 no funciona necesariamente en la detección de otro evento. En el presente caso, el evento MON15985 es un evento único caracterizado por las secuencias de unión únicas de las SEQ ID N°:14-18 y las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12, que se divulgan por primera vez en la presente invención. El presente método usado para detectar el evento MON15985 no puede derivar de manera evidente del estado de la técnica porque el estado del arte, descrito en D1-D7, no divulga las características técnicas del evento. Sin ninguna divulgación de las características técnicas del evento, el versado en la materia no podría diseñar una sonda/cebador que fuera específico para el evento MON15985 y a continuación producir un método para detectar el evento MON15985.

En la presente resolución se alega que una mejora en una inserción que no está asociada con una contribución extraordinaria no puede interpretarse como inventiva. El solicitante manifiesta su desacuerdo y refuta con las siguientes observaciones.

La técnica anterior, descrita en D7, describe varias docenas de eventos transgénicos de algodón que contienen una inserción Cry2Ab. En particular, la Tabla 11 de D7 demuestra un amplio rango de eventos transgénicos de algodón que contienen una inserción Cry2Ab, que tienen entre 0 ng de expresión de Cry2Ab por ml de extracto de callos de algodón y 2440 ng de expresión de Cry2Ab por ml de extracto de callos de algodón. La Tabla 7 de D7 demuestra una correlación de mayores expresiones de Cry2Ab con una mayor bioactividad contra determinados insectos. Es decir, no todos los eventos de inserción de Cry2Ab poseen una mayor actividad insecticida y por consiguiente, no todos los eventos son de valor comercial. En su lugar, no se sabía y no se divulgaba cuales de los eventos transgénicos de algodón, si alguno, divulgados en D7 tendrían ventajas comerciales.

Además, las caracterizaciones moleculares de los eventos transgénicos no son directas. Por ejemplo, el versado en la materia en la técnica esperaría que una sola inserción de ADN que codifica Cry2Ab produjera dos (2) secuencias de unión de inserción-genómicas; en su lugar, el evento MON15985 de la presente invención produjo en realidad cinco (5) secuencias de unión ubicadas sobre el mismo cromosoma junto con el ADN que codifica Cry2Ab. El evento MON15985 se seleccionó entre un gran número de eventos de inserción Cry2Ab basado en numerosas evaluaciones diferentes incluyendo la caracterización a nivel molecular con el fin de determinar si se introducían una o más secuencias de codificación Cry2Ab en el genoma durante el proceso transformación, evaluar la estructura molecular del ADN insertado por su integridad en comparación con la secuencia presente en el plásmido que contiene al ADN destinado para la inserción en el genoma vegetal, y la presencia o ausencia de cualquier segmento indeseable que pudiera surgir a partir del esqueleto del plásmido, así como estudios de campo, que incluyen ensayos de rendimiento y bioensayos. El evento particular MON15985 demostró ser comercialmente significativo con un mayor rendimiento de hilacha de algodón, un control de plagas más eficaz y una disminución en la contribución de las actividades físicas que un granjero que cultivara este evento

transgénico particular necesitara con el fin de lograr una ventaja de rendimiento significativa con respecto a las otras variedades de algodón. El hecho que el evento MON15985 se selecciona específicamente para una comercialización sin ambigüedades sugiere que dicho evento posee efectos técnicos sorprendentes o propiedades superiores con respecto a cualquier otro evento transgénico conocido de algodón o una variedad no transgénica.

Además, en las resoluciones demandadas la Superintendencia de Industria y Comercio argumenta que la determinación de secuencias de unión de genes blanco conocidos tales como los genes resistentes a insectos es una práctica común en el estado de la técnica.

Pongo de presente que los genes blanco, por ejemplo, un ADN que codifica Cry2Ab, que se pueden insertar en plantas pueden ser bien conocidos en la técnica, sin embargo, ninguna de las referencias citadas en la técnica provee ninguna información técnica sobre la secuencia de nucleótidos que codifica a la proteína Cry2Ab, o la posición relativa del transgen que codifica a la proteína Cry2Ab dentro del genoma vegetal. Como se describiera previamente, las referencias de la técnica citadas meramente mencionan los términos de BollgardII®, DP50BII, MON15985, DPL15985 y/o DP50BX sin ninguna divulgación sobre las caracterizaciones de los eventos transgénicos de la referencia. Es decir, ninguna de las referencias de la técnica citadas provee "el conocimiento técnico" del evento MON15985, mucho menos la capacidad para detectar específicamente dicho evento en una muestra de algodón. Por otro lado, la presente invención divulga, por primera vez, las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 así como las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12 que comprenden las secuencias de unión que se muestran en las SEQ ID N°:14-18 que son únicas para el evento MON15985 y, por ello, provee una capacidad, por primera vez, para detectar específicamente el evento particular MON15985 en una muestra de algodón.

Aún más, en las resoluciones demandadas se afirma que un técnico versado en la materia, que conoce el origen de la inserción y del gen exógeno, puede establecer/definir las sondas y secuencias de unión, y luego detectarlas.

En primer lugar, se pregunta a la Superintendencia de Industria y Comercio: ¿cuál de la(s) referencia(s) citada(s) provee(n) la información técnica sobre el origen de la inserción y del gen exógeno? La respuesta es "ninguna", porque ninguna de las referencias provee información técnica sobre la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab, o sobre la posición relativa del transgen que codifica la proteína Cry2Ab dentro del genoma vegetal. Dicha información técnica se divulga, por primera vez, en la presente invención. Esto significa, que sin la divulgación de la presente invención, un técnico versado en la materia no podría distinguir un evento de algodón que contiene Cry2Ab (MON15985) de otro evento de algodón que contiene Cry2Ab (MON15813), porque los dos eventos son idénticos con respecto a la proteína Cry2Ab expresada a partir del ADN insertado en el genoma de algodón, pero diferentes con respecto a la posición del ADN insertado que codifica a la proteína Cry2Ab dentro del genoma de algodón, y por ello exhibe secuencias de unión diferentes, lo cual precisamente es lo que da lugar a la novedad de las secuencias de unión que se describen en la presente memoria descriptiva con respecto a la detección del evento MON15985. Es decir, sin conocer las secuencias de unión que son únicas y específicas para el evento MON15985, no es posible diseñar sondas que son específicas para el evento

MON15985 particular, y a continuación detectar la presencia del ADN derivado del evento MON15985 en una muestra de algodón.

Además, en las resoluciones demandadas se alega que "a la luz que las secuencias de resistencia a insectos y su inserción son de dominio y conocimiento de un técnico versado en la materia, el aporte o mejoramiento de un evento anterior no puede considerarse inventivo". Respetuosamente disiento por las siguientes razones:

Como ya se argumentara repetidamente, ninguna de las referencias provee ninguna información técnica sobre la secuencia de nucleótidos que codifica a la proteína Cry2Ab, o la posición relativa del transgen que codifica la proteína Cry2Ab dentro del genoma vegetal. Dicha información técnica se divulga, por primera vez, en la presente invención. Es decir, las secuencias de resistencia a insectos y sus inserciones asociadas con el MON15985 de la presente invención NO son de dominio público antes de la divulgación de la presente invención. Como tal, la presente invención reivindicada constituye verdaderamente una actividad inventiva. La SIC puede estar confundiendo la divulgación de la *existencia* del evento MON15985 por unos pocos y selectos investigadores universitarios con la divulgación de la composición molecular del evento MON15985. Los investigadores universitarios individuales que divulgaron la mera *existencia* del evento MON15985 solamente pudieron hacerlo con relación a la divulgación del Solicitante de la *existencia* del evento MON15985 a dichos investigadores individuales. El Solicitante suministró muestras de semillas del evento MON15985 de algodón bajo estricta confidencialidad con el propósito de ayudar al Solicitante con las evaluaciones a campo del evento transgénico en comparación con las variedades no transgénicas y otros eventos transgénicos, e incluyó limitaciones sobre la capacidad de los investigadores para conducir ninguna evaluación molecular.

En vista de lo anterior, sin conocer las secuencias estructurales de diagnóstico del evento MON15985, el versado en la materia en la técnica no sabría cómo identificar o detectar dicho evento. La única información divulgada por la técnica anterior, incluyendo las referencias D1-D7 citadas, para el versado en la materia fue que el evento MON15985 y el evento MON15813 expresaban dos proteínas insecticidas diferentes, Cry2Ab y Cry1Ac. Esta información solamente no le provee al versado en la materia el conocimiento de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas. No se divulgó ninguna información acerca de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cry2Ab, ni tampoco la posición relativa del gen que codifica a la proteína Cry2Ab. Dado que las secuencias de nucleótidos que codifican a la proteína Cry2Ab eran desconocidas, entonces también se desconocía el conocimiento técnico del evento MON15985 suficiente para permitirle al versado en la materia identificar las secuencias reivindicadas y no se podrían haber identificado sin la divulgación de la presente invención. Dado que el evento MON15985 y el evento MON15813 eran idénticos con respecto a la proteína Cry2Ab expresada a partir del ADN insertado en el genoma de algodón, pero diferentes con respecto a la posición del ADN insertado que codifica a la proteína Cry2Ab dentro del genoma de algodón, el versado en la materia no podría distinguir un evento del otro sin la divulgación de la presente invención. Por lo tanto, la materia reivindicada en la presente invención es novedosa y exhibe actividad inventiva.

Además, el conocimiento técnico sobre un evento no se traduce en otro evento. Cada evento es único y se caracteriza por secuencias de diagnóstico únicas. La

~~26~~ 22 470 4119

Superintendencia de Industria y Comercio parece ser de la opinión que quien pueda identificar el evento A podría fácilmente identificar el evento B y que quienquiera que tenga la habilidad de detectar el evento A podría fácilmente detectar el evento B. Según este razonamiento, no se podrían conceder nunca más patentes relativas a otros eventos ya que la identificación y/o detección de cualquier otro evento sería obvia a partir del conocimiento sobre el evento A. Queda claro que esta posición de la Superintendencia de Industria y Comercio carece de mérito.

Como conclusión, la presente invención tal como se la reivindica es efectivamente tiene actividad inventiva respecto de D1-D7. Por lo tanto, los Honorables Consejeros deberán acceder a las pretensiones de esta demanda.

Estado de las solicitudes equivalentes

Adicionalmente, informo que las solicitudes correspondientes a la presente en los Estados Unidos, Australia y China han sido concedidas. Como referencia, adjunto las reivindicaciones concedidas en dichos países y solicito que esta información se tenga como un claro indicio de patentabilidad de la presente invención.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Fundamento esta demanda en las siguientes normas:

Artículos 85, 136, 206 a 211 del Código Contencioso Administrativo y todas las demás normas concordantes.

Artículos 15, literal b, 18, 25, y 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y todas las demás normas que resulten concordantes.

PRUEBAS

DOCUMENTALES:

1. 1 Solicito sean tenidas como tales los siguientes documentos:

Los antecedentes administrativos que contienen todas las pruebas y documentos allegados durante el trámite de solicitud de patente y la vía gubernativa.

Con el objeto de obtener todos y cada uno de estos documentos, respetuosamente solicito a los Honorables Consejeros que oficien a la entidad demandada para que remita el expediente No. 02.049.630, correspondiente a dicho trámite (C.C.A. Art.207 Nral. 6o.).

1.2 Declaración presentada por el solicitante MONSANTO TECHNOLOGY LLC ante la Oficina de Patentes de los Estados Unidos que prueba que la invención no era conocida antes de la fecha de prioridad y que la materia objeto fue suministrada a las personas que divulgaron información en la conferencia de Beltwide bajo términos de confidencialidad y con restricciones sobre publicación, uso, venta, etc.

DICTAMEN PERICIAL:

Solicito que se practique un dictamen pericial con intervención de peritos que sean profesionales en biotecnología, con el fin de que se determine: (1) si el proceso reivindicado en el invento llamado "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo", es o no esencialmente biológico; (2) si los términos "al menos" y "una porción de" son ambiguos para una persona versada en la materia técnica; (3) si la invención reivindicada comprende un único concepto inventivo; (4) si la invención tiene nivel inventivo sobre las referencias citadas por la entidad demandada.

El siguiente es el cuestionario que deberá ser resuelto por los peritos:

1. Teniendo en cuenta que las plantas de algodón tienen un sistema de polinización cerrado, por favor diga si el cruzamiento de una planta transgénica con una planta de algodón diferente (que podría ser una planta no transgénica) tiene lugar en forma natural, esto es sin la intervención del hombre.

2. De acuerdo con la presente invención, por favor diga si todas las plantas de progenie obtenidas como resultado del cruce de una planta transgénica que comprende la inserción MON15985 con una planta de algodón diferente tendrían la inserción de MON15985.

3. Con base en las pregunta 1, por favor indique si el paso a) de la reivindicación 7 de la solicitud corresponde a un proceso biológico natural.

4. Basándose en la información proporcionada por la descripción de la solicitud y en los conocimientos generales de un profesional en ingeniería genética, por favor indique si una planta recombinante/transformante y su progenie o el ADN del transformante que comprende el ADN insertado y sus secuencias de flanqueo inmediatamente adyacente al ADN insertado existen naturalmente. Por favor determinar si una célula vegetal transgénica que comprende la inserción MON15985 o las secuencias de unión o de amplicones de la presente invención existe en forma natural.

5. Con base en las preguntas anteriores, por favor informe si la intervención del hombre es necesaria para ejecutar el proceso definido en la reivindicación 7 de la solicitud.

6. Por favor establezca si los términos "al menos" en la reivindicación 8 y "una porción de" en las reivindicaciones 9 y 10 (dependientes de la reivindicación 8) cuando se hace referencia a una sonda o un cebador que es específico para detectar la inserción MON15985 se utilizan rutinariamente cuando se describen las sondas o cebadores y, establezca si estos términos resultan claros y concisos para un especialista en la materia técnica.

7. Teniendo en cuenta la información proporcionada en la reivindicación 8 de la presente solicitud en donde se indica que la molécula de ADN aislado comprende al menos quince nucleótidos, por favor establezca si la expresión "una porción de" en las reivindicaciones 9 y 10 sugiere claramente que las moléculas aisladas de ADN de las reivindicaciones 9 y 10 tienen una longitud de por lo menos quince nucleótidos.

Por favor responda las preguntas 8 a 12 teniendo en cuenta la información proporcionada por la solicitud, la figura 1 anexa y que:

El objeto de la presente invención se relaciona con una célula vegetal transgénica que comprende un inserto de ADN que codifica Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o una célula vegetal transgénica que comprende un inserto de ADN que codifica Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12.

8. Por favor diga si en la presente invención las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 están ligadas físicamente.

9. Por favor establezca si en la presente invención las SEQ ID N°:14, 15, 16, 17 y 18 son secuencias de unión y las SEQ ID N°:11 y 12 son secuencias de amplicones que son únicas para la inserción MON15985.

10. Por favor informe si en la presente invención la detección de cualquiera de las secuencias en una muestra que contiene ADN de algodón diagnostica la presencia de la inserción MON15985 en dicha muestra, y por ello necesariamente, también la presencia de cada una de las otras secuencias.

11. Por favor, informe si las cinco secuencias de unión o las dos secuencias de amplicones co-existen en la célula vegetal transgénica reivindicada y si dichas secuencias pueden examinarse juntas como una sola invención.

11. a). Por favor determine si cualquiera de las secuencias de unión de SEQ ID NO:14-18 existen en el genoma de una planta de algodón transgénica sin que existan las otras en el mismo genoma.

11.b). Por favor determine si una de las dos secuencias que corresponden a las SEQ ID NO: 11 y 12 existen en el genoma de una planta de algodón transgénica sin que exista la otra en el mismo genoma.

12. Por favor establezca si en la presente solicitud se contempla alguna invención diferente al evento de algodón MON15985 que contiene un grupo selecto de marcadores (es decir, las secuencias de unión o de amplicones) como resultado de la inserción del ADN transgénico en el genoma.

Con referencia a los documentos D1 a D7 adjuntos, sírvase responder las preguntas 13 a 24:

13. Por favor diga sí en los documentos D1 a D4, se revelan las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°: 11 y 12 que son exclusivas del evento MON15985.

14. Por favor diga si en el documento D5 se revela alguna secuencia que diagnostique la inserción MON15985.

15. Si bien D7 revela la co-expresión de Cry2Ab y otra δ-endotoxina Cry de *B. thuringiensis*, por favor diga si D7 divulga el evento MON15985 y alguna secuencia que diagnostique la inserción MON15985.

16. Por favor indique si una persona versada en el campo tecnológico podría desarrollar el evento de algodón MON15985 que contiene un grupo selecto de marcadores (las secuencias de unión o de amplicones) como resultado de la inserción del ADN transgénico en el genoma, partiendo de una simple referencia al termino MON15985.

17. Por favor establezca si las características estructurales exclusivas que pueden ser usadas para identificar el evento MON15985, se derivan evidentemente de los documentos D1 a D5 y D7.

18. Por favor establezca si la simple mención del término MON15985 constituye el conocimiento técnico suficiente para alcanzar el objeto de la presente invención.

19. Por favor, establezca si cada evento transgénico tiene características únicas, que incluyen secuencias de unión o de amplicón únicas suficientes para caracterizar el evento.

20. Con base en la pregunta 19 por favor diga si la solicitud en estudio revela, por primera vez, las secuencias de unión SEQ ID NOs:14-18 así como las secuencias de amplicón SEQ ID NOs:11-12 que son exclusivas del evento MON15985.

21. Con base en las preguntas 19 y 20, por favor diga si la presente invención proporciona, por primera vez, la información necesaria para detectar específicamente el evento particular MON15985 en una muestra de algodón.

22. Por favor, diga si el documento D6 se enseña o sugiere un método para detectar un evento de inserción de algodón que incluya las secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18, o las secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11 y 12.

23. Por favor, indique si una persona versada en la materia técnica, partiendo de la información de D6, se vería motivada a desarrollar un método de detección del evento de inserción MON15985 en algodón como se revindica en la presente solicitud.

24. Por favor, diga si los documentos D1 a D7 divulgan información alguna acerca de la secuencia de nucleótidos que codifica a la proteína Cry2Ab, o la posición relativa del gen que codifica a la proteína Cry2Ab.

ANEXOS

Presento con esta demanda los siguientes documentos:

1. Poder que me ha conferido la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC para presentar esta demanda de nulidad y continuar con el trámite hasta su culminación.

2. Copia simple de la Resolución No. 41832 del 13 de diciembre de 2007, expedida por el Superintendente de Industria y Comercio, Doctor Gustavo Valbuena Quiñones, por medio de la cual se negó el privilegio de patente a la invención llamada "Planta Evento de Algodón MON15985 y Composiciones y Métodos para la Detección del mismo".

3. Copia simple de la Resolución 16488 del 28 de mayo de 2008, por medio de la cual el Superintendente de Industria y Comercio, Doctor Gustavo Valbuena Quiñones, decidió el recurso el recurso de reposición interpuesto

40
28
424
423

en contra de la Resolución 41832 del 13 de diciembre de 2007, confirmando tal decisión.

4. Copia simple del recurso presentado en contra de la Resolución 41832 del 13 de diciembre de 2007.

5. Copia del memorial radicado el día 14 de octubre de 2008, ante el secretario de la División de Signos Distintivos de la Superintendencia de Industria y Comercio, solicitando que me fueran entregadas copias auténticas de las resoluciones demandadas, así como que se hiciera constar acerca de su notificación y ejecutoria.

6. Dos copias de esta demanda, con sus anexos, una para el demandado y otra para el Ministerio Público.

7. Una copia de esta demanda, sin sus anexos, para los archivos de su Despacho.

NOTIFICACIONES

La parte demandada (NACIÓN – SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO) recibirá notificaciones a través de su representante, el Superintendente de Industria y Comercio, Doctor Gustavo Valbuena Quiñones, o quien haga sus veces, en la carrera 13 No. 27-00, Bogota D.C., Colombia.

La parte demandante, la sociedad MONSANTO TECHNOLOGY LLC, y el suscrito recibiremos notificaciones en mi oficina de abogada, ubicada en la calle 94 A No. 7 A - 09, Bogotá D.C., Colombia o en la secretaría de su Despacho.

Señores consejeros,

Margarita Castellanos Abondano
T.P.A. No. 70819 del C.S. de la J.
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

AUTENTICACIÓN DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.C.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 35)
Notario Cuarenta y Uno (41) del circulo
de esta ciudad compareció personalmente:
Margarita Castellanos
identificado con C.C. 39779654
expedida en: usaquen y tarjeta profesional
70819 del Consejo
Consejo Sup
y declaro
este escrito es
Firma del declarante
En Bogotá D.C. a 20 OCT. 2008
AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
Carrera 12 Nº 93-26
AGUSTIN MORALES RIVERA

425
424

RESPUESTA A CONSEJO DE ESTADO
SALA DE LO CONTENCIOSO ADMINISTRATIVO
SECCIÓN SEGUNDA

ASUNTO	Proceso	2008-0378
	N° Expediente	02-49630
	Folios	13

Patente de Invención ■ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ■

Vía PCT (fase nacional) ☐ Cap.I ☐ Cap. II ☐

Fecha de Presentación Nacional. 11/06/2002

En atención al Consejo de Estado interpuesto, se hacen las siguientes aclaraciones:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios: 66 a 146 como se radicó inicialmente
Reivindicaciones:	Folios: 147 a 151 como se radicó inicialmente Folios: 278 a 282 modificadas el 04/10/2006 Folios: 337 a 341 modificadas el 12/07/2007
Figuras:	Folios: 43 a 59 como se radicó inicialmente.
Respuestas del solicitante:	Folios: 271 a 276 radicado el 04/10/2006 Folios: 326 a 335 radicado el 12/07/2007
Otros:	Conceptos técnicos realizados. Resolución N°41832 de negación de patente, folios 360 a 371, del 13/12/2007. Memorial de recurso de 17/01/2008, folios 372 a 383. Resolución N°16488 de recurso de reposición, folios 390 a 400, de 28/05/2008. Memorial Consejo de Estado
Prioridad:	11/06/2001, Estados Unidos, 60/297406

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Planta evento de algodón MON15985 y composiciones y métodos para detección del mismo".

La presente solicitud se refiere a una célula vegetal resistente a insectos, derivada de una planta de algodón evento MON 15985 depositada como ATCC PTA-2516, y que comprende un inserto Cry2Ab y por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada a partir del grupo de SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o CryA2b más las secuencias SEQ ID No 11 y SEQ ID No 12.

También se reivindica el método para producir una planta de algodón resistente a herbicidas que comprende cruzar una planta resistente a herbicidas con una no resistente y seleccionar la progenie.

Hacen parte de la invención las secuencias de ADN aisladas que comprenden las SEC ID:14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18. Además se reivindican métodos para detectar la presencia de la inserción MON15985 en el tejido de algodón que comprende la selección de cebadores que hibridizan sobre secuencias que flanquean la secuencia de inserción MON15985 y la amplificación del segmento de interés. Por último se reclaman los kits de detección de ADN que comprenden las sondas que hibridizan con las secuencias SEC ID No 14, SEC ID No 15, SEC ID No 17 y SEC ID No: 18 o que contienen los cebadores que hibridizan con las secuencias flanqueantes de MON 15985.

IPC: A01H 01/06, C12N 5/00

3. Respuesta a los argumentos del solicitante

3.1. Violación del literal b) del artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Esta oficina se pronunció en los diferentes requerimientos por artículo 45, resolución de negación y resolución de recurso, sobre la consideración de no invención para la reivindicación 7 de la presente solicitud. Específicamente, se considera que la reivindicación mencionada incumple el literal b) del artículo 15 de la D486, que establece:

*Art. 15. No se considerarán invenciones: b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, **los procesos biológicos naturales**, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural.*

La reivindicación 7 reclama: un método de producción de una planta resistente a insectos que comprende: a) el cruce de una planta resistente a insecto, que comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID N° 14-18, con una planta de algodón diferente; b) obtener al menos una planta de progenie derivada del cruce de (a); y c) seleccionar la progenie que sea resistente a insectos y comprende las secuencias de nucleótido de la SEQ ID N° 14-18.

El solicitante en su memorial al Consejo de Estado presenta dos argumentos, según los cuales el proceso reivindicado no se produce de forma natural:

En primer lugar, argumenta que "el algodón tiene un sistema de polinización cerrado; sin la intervención humana, no es posible producir plantas transgénicas endógenas ni híbridos. Esto significa que la intervención humana es absolutamente necesaria para el paso de cruzamiento (a) de la reivindicación 7, y dicho paso no es un paso biológico natural como se aduce en las resoluciones demandadas" (ver folio 10 del memorial de Consejo, penúltimo párrafo).

A este respecto esta oficina desea aclarar que tal como lo expresa el Manual Andino de Patentes[1], documento no vinculante pero que permite ilustrar la definición de ciertos conceptos comunes en materia de patentes, en el anexo IV sobre las decisiones del Tribunal Andino que trata sobre la prohibición de patentar especies y razas animales, se establece:

---

[1] Secretaría General de la Comunidad Andina. Manual para el examen de las solicitudes de patente de invención en las oficinas de Propiedad Industrial de los países de la Comunidad Andina. Lima, Perú, 2004.

"no gozan de protección aquellos procedimientos en los que no exista actividad humana (procedimientos *exclusivamente biológicos*- o <<biológicos naturales>> como los denomina el Artículo 15 párrafo b) de la Decisión 486-), o si existiendo ésta no es lo suficientemente relevante como para influir en la obtención de los resultados (procedimientos *esencialmente biológicos* –Artículo 7 letra c) de la Decisión 344-). La patentabilidad estará condicionada por tanto, a la intensidad o relevancia de la intervención técnica del hombre en las diversas etapas del procedimiento."

Con esta aclaración, esta oficina ratifica que tal como se manifestó en el concepto técnico de negación, el paso a) del método definido en la reivindicación 7 constituye el cruce entre plantas, lo cual implica necesariamente la etapa de reproducción, que constituye indiscutiblemente un proceso biológico, independientemente si este se efectúa entre organismos modificados genéticamente o no.

En el mismo sentido, se tiene que la planta de algodón se puede reproducir o polinizar por autofecundación ó a través de insectos polinizadores. Estos sistemas de reproducción son iguales para las plantas silvestres o las modificadas genéticamente, específicamente para la planta evento de algodón MON15985, dado que la planta de la solicitud no presenta una modificación genética que repercuta en cambios en la fisiología de la polinización.

Por tanto, un cruzamiento entre una planta modificada, tal como la de la solicitud y una planta diferente, tal como una planta silvestre, se puede dar sin la intervención del hombre para producir plantas híbridas, ó se puede realizar entre dos plantas modificadas para producir plantas transgénicas endógenas; puesto que estos cruzamientos se realizan de la misma manera como se hace el proceso biológico natural de polinización en plantas de algodón.

De igual manera, la etapa b) del método mencionado en la reivindicación 7 también constituye un proceso esencialmente biológico, puesto que el crecimiento de las plantas y la multiplicación de sus células para obtener una planta derivada del cruce del paso a), constituye el proceso biológico natural de crecimiento y desarrollo de una planta. En ningún caso, este proceso se ve afectado o modificado por que se trate de una planta híbrida o transgénica endógena; es decir, que este proceso no se diferencia del proceso de crecimiento y desarrollo de una planta silvestre de algodón y en ningún caso requiere la intervención del hombre. Por tanto, el paso b) de este método también incumple el literal b) del artículo 15 de la D486.

El segundo argumento del solicitante, es que "la reivindicación 7 incluye además un paso para seleccionar la progenie que comprende secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N° 14-18, y que son secuencias nuevas de ADN de unión transgénico-genómica a causa de la inserción del transgen. Esta etapa requiere ciertamente de la intervención técnica del hombre ya que no todas las plantas de la progenie tendrían la inserción de MON15985 de la presente invención y se requiere de un paso de análisis para identificar las plantas de la progenie que tienen la inserción de MON15985" (ver folio 10 memorial del Consejo, último párrafo).

Sobre este argumento, tal como se manifestó en la negación y en la respuesta al recurso de reposición, esta oficina considera que la fase c) del método planteado corresponde a la etapa de seleccionar un tipo de producto específico, en este caso la progenie que sea resistente a insectos y comprende las secuencias de

nucleótido de la SEQ ID N° 14-18. Sin embargo, el proceso por el cual se realiza esta selección no es especificado en esta reivindicación, es decir que esta selección no implica un método técnico determinado para realizarla.

De esta manera, en la presente solicitud no existe sustento para un método de diagnóstico "con intervención humana" indicando la secuencia lógica de etapas y las condiciones a las cuales se efectúa cada una de ellas, que lo pudiesen diferenciar de las técnicas de PCR o hibridización convencionales.

Vale la pena resaltar que la cláusula 7 reclama expresamente un método para producir una planta de algodón resistente a insecto, donde la primera etapa (a) constituye el cruce de una planta resistente con una no resistente. Dicha primera etapa es obligatoria, de lo contrario las siguientes no pueden llevarse a cabo, luego el elemento central del método reivindicado es justamente dicha etapa que abarca procesos biológicos naturales que dependen exclusivamente de la naturaleza y es por esto que la materia reivindicada en la cláusula en mención no constituye una invención de acuerdo con el artículo 15 de la Decisión 486.

Por último, se aclara que pese a lo argumentado por el solicitante en lo que se refiere al evento transgénico o de transformación, donde dice que "este no sucede en forma natural y que la intervención humana es absolutamente necesaria para que este se produzca" (ver folio 11 del memorial del Consejo, párrafo 3), tal argumento esta fuera de contexto, puesto que el requerimiento por incumplimiento del Artículo 15 literal b), se realiza es al método de producción de una planta resistente a insectos detallada en la reivindicación 7, específicamente a las etapas a y b antes discutidas, y no al proceso de transformación genética como tal.

3.2. Violación del artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Esta oficina se pronunció en los diferentes requerimientos por artículo 45, resolución de negación y resolución de recurso, sobre la falta de claridad del capítulo reivindicatorio. Específicamente, se objetaron las cláusulas 8-10 y 16, que reclaman moléculas de ADN que "comprenden al menos" una porción de unas secuencia o que "traslapa al menos" una secuencia o un kit que contiene una molécula que comprende "al menos".., abarcando materia que va mas allá de la verdaderamente divulgada. En cualquiera de los casos anteriores en los que no se limita la reclamación a una secuencia exacta, se reivindican un sinnúmero de moléculas que pueden no tener ninguna relación con el objeto de la presente invención.

Las reivindicaciones que utilizan términos ambiguos que no permiten definir la invención de una manera clara y concisa, se considera que incumplen con el artículo 30 de la Decisión 486, que establece:

Artículo 30. "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

La reivindicación 8 reclama: Una molécula de ADN aislado, que comprende al menos 15 nucleótidos de la SEQ ID N°11 o la SEQ ID N°12 o sus complementos,

425
426

y traslapa al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID N°14; SEQ ID N°15; SEQ ID N°16; SEQ ID N°17, y SEQ ID N°18 o los complementos de esta.

La reivindicación 9 reclama: La molécula de ADN aislado de la reivindicación 8 que comprende la SEQ ID N°11 o su complemento, o una porción de la SEQ ID N°11 o su complemento que traslapa al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID N°14; SEQ ID N°15; SEQ ID N°16; SEQ ID N°17, y SEQ ID N°18 o los complementos de esta.

La reivindicación 10 reclama: La molécula de ADN aislado de la reivindicación 8 que comprende la SEQ ID N°12 o su complemento, o una porción de la SEQ ID N°12 o su complemento que traslapa al menos una secuencia de conexión seleccionada de la SEQ ID N°17 y la SEQ ID N°18 o los complementos de esta.

El solicitante por su parte en su memorial al Consejo de Estado manifiesta:

"...los términos "al menos" y "una porción de" cuando se hace referencia a una sonda o un cebador que es específico para detectar el inserto M0N15985 no resultan ambiguos para un especialista en la materia, y que dichos terminos se utilizan rutinariamente cuando se describen las sondas o cebadores. Seria una limitación injusta si las reivindicaciones se limitaran a una secuencia precisa. Además, como las reivindicaciones 9 y 10 dependen de la reivindicación 8, que indica al menos quince nucleótidos, la definición de "una porción de" en las reivindicaciones 9 y 10 sugiere claramente que las moléculas aisladas de ADN de las reivindicaciones 9 y 10 tienen una longitud de por lo menos quince nucleótidos" (ver folio 12 del memorial del Consejo de Estado, párrafo 3).

Este despacho reitera su posición sobre los términos ambiguos e imprecisos que utiliza la solicitud y que son considerados como tal, toda vez que no permiten establecer claramente el objeto y el alcance de las reclamaciones. En la experiencia de un técnico versado en la materia estos términos podrían ser de uso habitual, pero para la definición clara y concisa de un desarrollo carecen de veracidad.

Por ejemplo, al analizar la reivindicación 8 se tiene que las SEQ ID 11 y 12 mencionadas, tienen una longitud de 2267 y 1360 nucleótidos (nt), respectivamente, mientras que las SEQ ID N°14 a 18 tienen una longitud de 20 nucleótidos cada una. Así las cosas, de la SEQ ID N°11, que contiene a su vez las SEQ ID N° 14 a 16, se podrían formar 29 moléculas de DNA y sus respectivos complementos, que contengan o traslapen la SEQ N°14 y que cumplen con las características dadas, es decir de al menos 15 nt y que contengan al menos una secuencia de conexión (los 15 nt haciendo parte de la SEQ N°14, 14 nt haciendo parte de esta secuencia y un nt anexo, y así hasta con un único nt de esta secuencia y el resto de la región anexa, en cualquiera de los flancos de la misma). De igual forma sucede teniendo en cuenta solo la SEQ ID N°15 ó la SEQ ID N°16. Esto evidencia que la utilización del término "al menos" no permite establecer y limitar claramente el objeto de la reivindicación.

Lo mismo sucede con las reivindicaciones 8 y 9, donde las posibles moléculas de DNA para formar cebadores, alcanzan un número alto de posibilidades.

Teniendo en cuenta que el alcance de la protección esta delimitado por las reivindicaciones, tal como establece el artículo 51 de la Decisión 486, y al emplear términos imprecisos se reclama materia que resulta más amplia y especulativa, respecto de la verdaderamente divulgada. Dichos términos imprecisos impiden

que una tercero pueda identificar con exactitud hasta donde llega la protección solicitada.

Con todo lo anterior, esta oficina desea manifestar que mantiene su objeción a las reivindicaciones mencionadas por considerar que incumplen el artículo 30 de la Decisión 486.

3.3. Violación del artículo 25 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Esta oficina se había pronunciado en los requerimientos por Artículo 45 y la resolución de negación sobre la carencia de unidad de invención que presentaba la solicitud, referida a las reivindicaciones 2, 3 y 11.

Si la solicitud de patente no posee un único concepto común inventivo, esta carece de unidad de invención. Esta apreciación se hace a través del estudio del capítulo reivindicatorio en el cual las reivindicaciones en su conjunto deben tener una característica común nueva e inventiva, que pueda vincular a todas las posibles invenciones reivindicadas. De otra manera se considera que la invención carece de unidad de invención e incumple el artículo 25 de la Decisión 486, que establece:

Artículo 25: "La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo."

La reivindicación 2 reclama: una célula de planta de algodón resistente a insecto, que comprende incorporada en el genoma de la célula vegetal un Cry2Ab y ADN que codifica el inserto que tiene una secuencia de nucleótido de la SEQ ID N°14, SEQ ID N°15; SEQ ID N°16; SEQ ID N°17, **y** SEQ ID N°18.

La reivindicación 3 reclama: una célula de planta de algodón resistente a insecto, que comprende incorporada en el genoma de la célula vegetal ADn que codifica Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias de nucleótido de la SEQ ID N°11 **y** SEQ ID N°12.

La reivindicación 11 reclama: Una molécula de ADN aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que comprende la SEQ ID N°14, SEQ ID N°15; SEQ ID N°16; SEQ ID N°17, **ó** SEQ ID N°18.

El solicitante por su parte, manifiesta en su memorial del Consejo de Estado que:

"...la célula vegetal transgénica reivindicada comprende una inserción Cry2Ab y todas las cinco secuencias de unión de las SEQ ID N°:14-18 (véase la reivindicación dependiente 2) o comprende una inserción Cry2Ab y ambas secuencias de amplicones de las SEQ ID N°:11-12 (véase la reivindicación dependiente 3). Una célula que comprende una inserción que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:14-18 (secuencias de unión) incluye una célula que comprende una inserción que codifica Cry2Ab y las SEQ ID N°:11-12 (secuencias de amplicones)" (ver folio 14 memorial del Consejo de Estado, párrafo 3).

A este respecto, esta oficina desea aclarar, tal como manifestó en la respuesta al recurso de reposición, que las aclaraciones del solicitante sobre las secuencias reclamadas y su característica de continuidad física este despacho debe enfatizar en el hecho de que de tratarse secuencias físicamente ligadas, continuas y en todo evento presentes, corresponderían exactamente a una única secuencia, en ningún caso reclamada como tal. Adicionalmente porque las secuencias llamadas

426
427

por el solicitante de "amplicones" incluyen las secuencias de unión, de manera que la reclamación debiese haber correspondido con una construcción específica de secuencia única.

Sin haberse reclamado como tal las secuencias se entienden como independientes presentes, ausentes o en combinación en el evento y que al diferir estructuralmente originan diferentes inserciones.

De esta manera la objeción realizada por este despacho tiene como fundamento la forma en que el mismo solicitante presento su invención y la reclamó. Al presentar diferentes secuencias como características del evento se reclamaron desarrollos independientes.

3.4. Violación del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Esta oficina se había pronunciado en el 2do requerimiento por Artículo 45, resolución de negación y respuesta a recurso de reposición, sobre la carencia de nivel inventivo que presentaba la solicitud, frente a las divulgaciones hechas en los documentos D1 a D7.

Estos documentos son:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	Evaluation of BollgardII (cv. DP50BII) in the mississippi delta: field eficacy against various lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab"	Ene 9-13, 2001
D2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	Field efficacy of cotton expressing tow insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis"	Ene. 9-13, 2001
D3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	"Performance of bollgard II cotton against lepidopterous pests in the lower rio grande valley of texas"	Ene. 9-13, 2001
D4	JACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 815-819	Efficacy of bollgard and bollgard II cottons against bollworm , Helicoverpa zea (Boddie) in field and greenhous studies"	Ene. 9-13, 2001
D5	STEWART S. D, ET AL: Journal of Economic Entomology vol. 94, no. 3, pages 752-760	"Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae" (2001-06), ,	Jun 2001
D6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	: "Development Of A Line Specific GMO Detection Method A Case Study"	Sep 22, 1999
D7	WO0026371	Methods For Transforming Plants To Express Bacillus Thuringiensis Delta-Endotoxins.	May 11, 2000

Se reitera que para la presente solicitud, la objeción fue efectuada por nivel inventivo y para este caso las anterioridades solo deben divulgar elementos que combinados con los conocimientos de una persona medianamente versada en la materia permiten llegar sin ningún esfuerzo a la invención reclamada. Es por ello, que se considera que la invención incumple con el artículo 18 de la Decisión 486.

Artículo 18. "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El solicitante, en su memorial al Consejo de Estado manifiesta sobre la determinación del estado de la técnica, que no se determinó acertadamente la misma, porque no se estableció claramente la fecha de publicación de las anterioridades D1 a D4, que permitan determinarlas como válidas para el estudio de patentabilidad de la invención reivindicada (ver folio 16, párrafo 4).

A este respecto, esta oficina aclara que las fechas de publicación de estos documentos se habían indicado claramente desde el 2do requerimiento de artículo 45, en la tabla de listado de documentos donde se coloca este dato. Esta misma información también se había dado en el concepto técnico de negación e incluso aparece en la resolución N° 41832.

Adicionalmente, para confirmar la veracidad de la fecha de publicación de los documentos D1 a D4, se anexa la información obtenida a través del portal web del Journal of Cotton Science, en la cual se indica las fechas de publicación para cada ejemplar del "*Proceedings- Beltwide Cotton Conferences*" y aparece como fecha para el ejemplar del año 2001: Enero 9-13 (ver Anexo 1).

De esta manera, se confirma que los documentos mencionados si hacían parte del estado de la técnica, puesto que son anteriores a la fecha de prioridad de la solicitud que es el 11 de Junio de 2001.

El solicitante, también argumenta que los documentos citados como anterioridades no afectan el nivel inventivo de la solicitud puesto que ninguno de ellos divulgaba las secuencias de unión o amplicones del evento MON15985.

A este respecto, esta oficina reitera los argumentos expuestos en los conceptos de negación y respuesta al recurso de reposición, que se resumen a continuación:

Las reivindicaciones 1 a 3 y dependientes reclaman una célula vegetal derivada de una planta resistente a insectos (PTA 2526 - evento MON 15985) caracterizada en que comprende un inserto del gen CryA2b acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12 para la generación de plantas de algodón resistentes a insectos incluidas las células de plantas transformadas con genes codificantes para proteínas con actividad insecticida.

Se resumen las divulgaciones de las anterioridades citadas (D1 – D7) como sigue:

- D1 divulga variedades transgénicas de algodón que contiene el inserto Cry2Ab.

- D2 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard II^{TM} que expresa las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab.

- D3 divulga cultivares de algodón transgénico que expresan las proteínas exógenas Cry1Ac y Cry2Ab, correspondientes con los eventos MON15985 y MON15813.

- D4 divulga la variedad de algodón transgénico Bollgard II.

- D5 divulga un algodón transgénico que expresa dos proteínas exógenas Cry2Ab y Cry1Ac, eventos denominados MON15985 y MON15813. Este

429
428

documento menciona el impacto que presenta la planta de algodón que expresa una o dos endotoxinas de *B.thuringiensis* sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de Lepidóptera.

- D6 presenta un método de detección específica de organismos genéticamente modificados (OGM) que no requiere conocer la secuencia del segmento de ADN insertado.

- D7 enseña segmentos de ácidos nucleicos que comprenden la proteína Cry2Ab y se insertan en vectores de expresión y en plantas. Además, divulga un método para expresar la δ-endotoxina Cry2A localizada en un organela o compartimiento subcelular en plantas y plantas que comprenden una secuencia de polinucleotidos que codifica una δ-endotoxina Cry2A. Divulga la co-expresion de Cry2Ab y otra δ-endotoxina Cry de *B. thuringiensis*.

La presente solicitud difiere de las anterioridades en que el gen CryA2b está acompañado de las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18. Sin embargo, de la lectura de toda la solicitud no existe un solo ensayo que demuestre que estas secuencias le atribuyen al inserto una ventaja técnica respecto de los eventos divulgados en las anterioridades D1 a D5.

El solicitante indica en la respuesta de julio del 2007 que : "las plantas de algodón MON15985 suministras ventajas agronómicas a un cultivador". Sin embargo las plantas de las anterioridades D1 a D5, también son MON1585 y también suministran ventajas agronómicas al cultivador. Así pues que así el solicitante insista en lo contrario, el elemento diferencial entre la presente invención y las divulgadas en el estado de la técnica (Secuencias 14 a 18), no representa un aporte significativo al estado de la técnica, pues no existe evidencia acerca de un efecto técnico atribuido justa y exclusivamente a las secuencias SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18.

Por otra parte la reivindicación 4 reclama la célula de planta resistente a insectos de la reivindicación 2 que además comprende un cassette codificante para CryAc1. Entonces, el problema a resolver con la presente solicitud sería generar plantas de algodón alternativas que comprendan los genes CryAb y CryAc para conferir resistencia a insectos.

En el documento D5 se enseña que las plantas de algodón MON 1585 pueden expresar una o más proteínas insecticidas de B. Thuringiensis (D5), dentro de las que son bien conocidas Cry1Ac y Cry2Ab. El documento D7 describe el método de expresar la Cry2A delta endotoxina en plantas y describe la co-expresión de CryA2b con otra endotoxina.

Ahora bien, considerando que la introducción de más de una proteína insecticida en un mismo evento de algodón transgénico ya había sido sugerida por D5, y que en la presente solicitud no existe evidencia de un efecto técnico ventajoso respecto a los eventos de algodón transgénico divulgados en las anterioridades, se conceptúa el evento de inserción reivindicado en las clausulas 4 a 6 representa una modificación que no es significativamente superior al estado del arte, que es producto de una selección arbitraria de una inserción aleatoria, a la cual hubiera podido llegar cualquier persona versada en la materia sin ninguna actividad inventiva (la posición de la inserción no fue planeada con el objeto de obtener resultados inesperados).

Las reivindicaciones 12 a 15 reclaman métodos para detectar la inserción de MON15985, que consisten en la amplificación simple de determinados segmentos del genoma empleando cebadores seleccionados y examinando el amplicón obtenido; así como métodos que emplean el principio de hibridización para detectar ciertas regiones del genoma complementarios a ciertas sondas escogidas.

El documento D6 divulga un procedimiento basado en PCR empleando primers contra las secuencias que flanquean el inserto.

En la presente solicitud seleccionaron primes arbitrariamente para identificar secuencias flanqueantes del inserto de interés, denominadas de diagnóstico, las cuales son útiles para el diseño de sondas que permiten la identificación del evento por hibridización.

Basados en el hecho que cualquier persona versada en técnicas de biología molecular conoce muy bien el concepto de emplear PCR para determinar la secuencias de regiones de interés así como los principios de hibridización y diseño de sondas, resulta que los procedimientos empleados por el solicitante para la detección de un inserto determinado se derivan evidentemente del estado de la técnica.

Es decir, a pesar que se efectué una selección de determinados cebadores o sondas, el método no va a diferir de los empleados constantemente en los ensayos de caracterización molecular, pues cualquier técnico versado en la materia, como actividad de rutina selecciona primers y sondas que puedan hibridizar son sus secuencias blanco. De esta forma, los métodos reclamados más bien representan el uso de las sondas y cebadores seleccionados en métodos corrientes, pero que no le atribuyen ninguna ventaja técnica sobre los que ya existen en el estado de la técnica. Los kits (reiv 16 a 17) caracterizados por contener un ADN que hibridiza con las secuencias flanqueantes tampoco exhiben altura inventiva alguna.

De esta manera, el hecho de que los documentos citados no especifiquen la secuencia del evento MON15985, a la luz de que son las secuencias de unión y no la inserción como tal el núcleo de la invención y que las secuencias de genes de resistencia a insectos y su inserción son de dominio y conocimiento de un técnico versado en la materia el aporte o mejoramiento de un evento anterior no puede considerarse inventivo.

Al encontrarse en los documentos D1 a D7, de manera independiente o combinada, la materia que sirvió de partida para que un técnico medianamente versado en la materia haciendo uso de sus propios conocimientos llegara a encontrar secuencias diagnósticas para la detección de un determinado inserto, dichos documentos son totalmente relevantes para la afectación de nivel inventivo y por tanto, la invención de la solicitud incumple con el artículo 18 de la Decisión 486.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

430
429

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	ADAMCZYK, J.J., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 835-837	1 a 6,	Nivel Inventivo
D2	AKIN, D.S., ET AL. Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 1041-1043	1 a 6,	Nivel Inventivo
D3	NORMAN, J.W., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001 pages 833-835.	1 a 6	Nivel Inventivo
D4	JACKSON, R.E., ET AL Proceedings of the Beltwide cotton conference, vol. 2, 2001, pages 815-819	1 a 6	Nivel Inventivo
D5	STEWART S D ET AL: Journal Of Economic Entomology, vol. 94, N° 3, pages 752-760	1 a 6	Nivel Inventivo
D6	WINDELS P ET AL. Mededelingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, BE, vol. 64, no. 5B, 22. pages 459-462.	12 a 17	Nivel Inventivo
7	WO0026371	1 a 6	Nivel Inventivo

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Negar** las reivindicaciones: 1 a 17 (folios:337 a 341).

3.5. Consideraciones sobre el dictamen pericial

Sobre la solicitud de un dictamen pericial con intervención de peritos que sean profesionales en biotecnología y cuyo cuestionario esta conformado por 24 preguntas (folios 23 a 25 del memorial al Consejo de Estado), esta oficina tiene las siguientes consideraciones:

En primer lugar, la solicitud de un perito con perfil de biotecnólogo o con conocimientos en esta área, es acertada para la comprensión y evaluación de la solicitud.

Sobre cada una de las preguntas formuladas, siguiendo la misma numeración dada en el cuestionario, consideramos:

1. Para resolver esta primera pregunta sería relevante indicarle al perito la característica o gen heterólogo que presenta la planta transgénica, puesto que para cualquier experto esta respuesta depende de si la transformación implica una modificación en el sistema de polinización u otro evento de fecundación y/o reproducción. Por ejemplo, se podría indicar que la planta transgénica presenta un inserto del gen Cry2Ab de *B.thuringiensis*.

2. La segunda pregunta esta bien formulada.

3. La tercera pregunta estaría bien formulada, siempre que se realice la modificación indicada en la pregunta 1.

4. Esta pregunta presenta un sesgo en su formulación, puesto que la solicitud no se ha objetado porque la planta transformada, el ADN insertado o la célula transformada se considere que existe en forma natural, sino porque los procedimientos para su cruzamiento corresponden a procesos esencialmente biológicos, lo cual es un asunto diferente.

5. Dado que existe un sesgo en la pregunta 4, sería mejor no hacer referencia a esta (o eliminarla) para poder plantear la pregunta 5.

6. Esta pregunta esta bien formulada.

7. En esta pregunta se debería preguntar explícitamente si las moléculas aisladas de ADN de las reividicaciones 9 y 10 tienen una longitud de por lo menos 15 nucleótidos **y** cuales son esos 15 nucleótidos.

8. Preguntas 8 a 11b están bien formuladas, para analizar las secuencias de conexión del inserto MON15985.

12. Para esta pregunta es importante aclararle al perito que tal consideración de única invención se hace con respecto al capítulo reivindicatorio presentado, teniendo en cuenta el(los) producto(s) o procedimiento(s) al que se refiere cada reivindicación o grupo de reivindicaciones.

13. Sobre las preguntas 13 a 24, referidas a los documentos D1 a D7 y la consideración de nivel inventivo de la solicitud, estas preguntas son capciosas para el experto puesto que todas están dirigidas a que él indique si las secuencias N°14 a 18 han sido divulgadas. Sin embargo, esto no permite esclarecer la patentabilidad de la invención puesto que no se cuestiona sobre el aporte que representa el conocer las secuencias flanqueantes de un inserto, tales como las SEQ N°14-18.

16. Por otra parte, la indicación que se hace en las preguntas 16 y 18 sobre la referencia al término MON15985 resulta imprecisa, puesto que no es la sola mención de este término lo que aportan las anterioridades, sino que para el experto en la materia también es conocido el gen que incluye tal evento, la proteína que produce y el efecto de resistencia a lepidópteros que tiene tal inserción.

23. Podría ser relevante preguntar si conociendo el gen Cry2Ab y el efecto del mismo, representa dificultad conocer o utilizar las secuencias flanqueantes del mismo para determinar la presencia de este gen en una planta transgénica y con que metodología las determinaría.

Otra pregunta relevante es: una planta de algodón que presenta el evento MON15985 es diferente o presenta alguna modificación o mejora respecto a una planta que presente el evento MON15985 y las SEQ 14-18 flanqueantes?

CONCEPTO TÉCNICO No. 4386	DIRECTOR DE NUEVAS CREACIONES (E)	**EXAMINADOR TÉCNICO** Código No.202052

ANEXO 1.

JOURNAL OF COTTON SCIENCE

Guidelines for Preparing Beltwide Cotton Conference References

Please refer to this listing of Beltwide Cotton Conferences when preparing references for the *Journal of Cotton Science*.

Before 1967, publications were by separate research conferences as shown here:

Proc. Cotton Dis. Counc. (26th), Cotton Defoliation- Physiol. Conf (20th), Cotton Improvement Conf. (18th), Memphis, TN 11-12 Jan. 1966. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN.

From 1967 through 1990, publication was named *Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conferences*. Use the following format.

For 1967:

Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Dallas, TX. 10-11 Jan. 1967. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN.

1968 Hot Springs, AR 9-10 Jan.
1969 New Orleans, LA 7-8 Jan.
1970 Houston, TX 6-7 Jan.
1971 Atlanta, GA 12-13 Jan.
1972 Memphis, TN 10-12 Jan.
1973 Phoenix, AZ 9-10 Jan.
1974 Dallas, TX 7-9 Jan.
1975 New Orleans, LA 6-8 Jan.
1976 Las Vegas, NV 5-7 Jan.
1977 Atlanta, GA 10-12 Jan.
1978 Dallas, TX 9-11 Jan.
1979 Phoenix, AZ 7-11 Jan.
1980 St. Louis, MO 6-10 Jan.
1981 New Orleans, LA 4-8 Jan.
1982 Las Vegas, NV 3-7 Jan.
1983 San Antonio, TX 2-6 Jan.
1984 Atlanta, GA 8-12 Jan.
1985 New Orleans, LA 6-11 Jan.
1986 Las Vegas, NV 4-9 Jan.
1987 Dallas, TX 4-8 Jan.
1988 New Orleans, LA 3-8 Jan.
1989 Nashville, TN 2-7 Jan.
1990 Las Vegas, NV 9-14 Jan.

From 1991 to the present, publication is referred to as *Proceedings – Beltwide Cotton Conferences.* Use the following format.

For 1991:

Proc. Beltwide Cotton Conf., San Antonio, TX. 6-10 Jan. 1991. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN.

1992 Nashville, TN 6-10 Jan.
1993 New Orleans, TN 10-14 Jan.
1994 San Diego, CA 5-8 Jan.
1995 San Antonio, TX 4-7 Jan.
1996 Nashville, TN 9-12 Jan.
1997 New Orleans, LA 7-10 Jan.
1998 San Diego, CA 5-9 Jan.
1999 Orlando, FL 3-7 Jan.
2000 San Antonio, TX 4-8 Jan.
2001 Anaheim, CA 9-13 Jan.
2002 Atlanta, GA 8-13 Jan.
2003 Nashville, TN 6-10 Jan.
2004 San Antonio, TX 5-9 Jan.
2005 New Orleans, LA 4-7 Jan.
2006 San Antonio, TX 3-6 Jan.
2007 New Orleans, LA 9-12 Jan.