

DOCTORA:

EDNA MARCELA RAMÍREZ OROZCO

DIRECTORA NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

REF. EXPEDIENTE No.: NC2019/0014435.
PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA EXTRACCIÓN DE SÓLIDOS DE LOS GRANOS DE CAFÉ Y UNA CONSTRUCCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE UNA SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UN AGENTE DE EDICIÓN DEL ADN DIRIGIDO A LA ALFA-D-GALACTOSIDASA DEL CAFÉ ESTANDO UNIDO OPERATIVAMENTE A UN PROMOTOR VEGETAL.
SOLICITUD PATENTE:
SOLICITANTE: TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED.

RESPUESTA A REQUERIMIENTO OFICIAL **OFICIO NO. 15579** NOTIFICADO EL 30 DE SEPTIEMBRE DE 2022.

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá D.C., identificada con cedula No 40.017.374, en mi condición de apoderada de la sociedad **TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED.**, por el presente escrito y estando dentro del término legal para hacerlo, doy respuesta al oficio arriba referenciado, de acuerdo con lo siguiente:

En respuesta al oficio No. 15579, a continuación, encuentran:

- i. Respuesta a los puntos del requerimiento
 - Respuesta punto por punto a los requerimientos del examinador.
- ii. Adjunto a este memorial se presentan los siguientes documentos
 - Nuevo capítulo reivindicatorio.
 - Comprobante de pago por las modificaciones al capítulo reivindicatorio.
 - Martellosi et al. (2005) referenciado en esta repuesta.

1. De la solicitud de patente.

Reivindicaciones

- Menciona el examinador que la reivindicación 1 no es clara porque menciona *"someter una célula vegetal de café a un agente de edición del ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico"* pero dicha expresión no es precisa y no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere mencionar el nombre de las enzimas y/o sistemas que permiten editar el ADN, según lo divulgado en el capítulo descriptivo.

El Examinador objetó la claridad de la frase *"someter una célula vegetal de café a un agente de edición del ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico"* de la antigua reivindicación 1 y sugiere que debería modificar la redacción para mencionar una enzima específica. En este sentido, las nuevas reivindicaciones 1 y 11 ahora se han modificado para especificar que el agente de edición de ADN es *"de un sistema de edición del ADN que corresponde a CRISPR-Cas"*. Teniendo en cuenta que la antigua reivindicación 6 (nueva reivindicación 5) depende y se refiere a la reivindicación 1, es claro para el solicitante que la persona versada en la materia comprendería las características de la construcción de ácido nucleico de la nueva reivindicación 5, sin necesidad de especificarlo o hacer aclaraciones adicionales. El solicitante entiende entonces que la objeción ha sido subsanada.

- Menciona el examinador que la reivindicación 5 no es clara porque menciona *"dicha mutación se selecciona de entre el grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel) y una sustitución"* sin embargo, la reivindicación 26 menciona que se trata de una planta no transgénica que de acuerdo con la descripción presenta dicho nombre porque *"la planta no comprende un transgén que codifique el agente de edición del ADN, un transgén que codifica un marcador genético o un*

indicador, o no comprende un transgén que codifique cualquiera de entre un agente de edición de ADN, el marcador genético, o el indicador” de esta forma, no es claro por qué se incluye inserción como posible opción en la reivindicación 5 dado que carece de sustento para mutaciones de inserción porque solamente se observaron deleciones (Fig. 4C) e indels (Figs. 5C y 6C).

El solicitante para evitar posibles contradicciones en el capítulo reivindicatorio, ha eliminado la reivindicación 26, por lo que, en criterio del solicitante ya no existe contradicciones. Para el solicitante es claro que la nueva reivindicación 1 es clara.

- Manifiesta el examinador que la reivindicación 6 no es clara porque menciona *“en el que la etapa (a) de someter es a una construcción de ácido nucleico que codifica dicho agente de edición del ADN”* pero no menciona las características técnicas esenciales de la construcción de ácido nucleico. Adicionalmente menciona el examinador que la frase *“someter es a una construcción de ácido nucleico que codifica dicho agente de edición del ADN”* no es clara y debe ser redactada correctamente de acuerdo con la intención de esta.

El solicitante ha modificado la redacción de la nueva reivindicación 5 (antigua reivindicación 6) para que esta sea clara, por otro lado y como se mencionó anteriormente es claro para el solicitante que la persona versada en la materia comprendería las características de la construcción de ácido nucleico de la nueva reivindicación 5, sin necesidad de especificarlo o hacer aclaraciones adicionales. El solicitante entiende entonces que la objeción ha sido subsanada.

- El examinador objeta las reivindicaciones 7 y 15 porque, estas reivindicaciones no presentan sustento al mencionar *“En los que dicho agente de edición del ADN es un sistema de edición de ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc 10 (ZFN),*

nucleasas efectoras tipo activadoras de la transcripción (TALEN) y CRISPR-Cas" lo que da lugar a un gran número de opciones de sistemas de edición que no son explorados por el solicitante, dado que en el capítulo descriptivo solo se refieren a un sistema CRISPR-Cas. Sugiere el examinador limitar las reivindicaciones a los sistemas que estén soportados en la descripción.

El solicitante ha eliminado las antiguas reivindicaciones 7 y 15.

- Manifiesta el examinador que la reivindicación 14 no es clara porque menciona *"La construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de edición del ADN dirigido a la alfa-D- galactosidasa estando unido operativamente a un promotor vegetal del café"* pero la construcción solamente está definida con base en la secuencia a la que se dirige y no menciona cual es la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de edición y cuál es el agente de edición. Sugiere el examinador mencionar cuál es el agente de edición y las secuencias correspondientes de acuerdo con lo mencionado en el capítulo descriptivo. Adicionalmente el examinador recomienda que, al tratarse de una reivindicación independiente también debería mencionar en el preámbulo *"Una construcción de ácido nucleico"* y no *"La construcción de ácido nucleico"*.

El solicitante ha modificado la antigua reivindicación 14 (nueva reivindicación 11) mencionando el agente de edición esto complementado con las secuencias correspondientes de acuerdo con lo mencionado en el capítulo descriptivo. Adicionalmente se ha modificado el preámbulo según lo recomendado por el examinador.

- Manifiesta el examinador que la reivindicación 21 no es clara porque mencionan *"en los que dicho agente de edición del ADN se dirige a una pluralidad de dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicha alfa-D-galactosidasa"* pero no es claro que un solo agente se dirija a varias

secuencias que codifican para alfa-D-galactosidasa, ni tampoco se mencionan las secuencias de los agentes de edición.

El solicitante quisiera pedir al examinador tener en cuenta que las SEQ ID NO: 9 a 41 se describen como secuencias de sgRNA en la Tabla A en la página 25 del capítulo descriptivo tal y como se presentó el 19 de diciembre de 2019. Estos sgRNA se pueden usar en un sistema de edición de ADN CRISPR-Cas para apuntar a una pluralidad de genes de alfa-D-galactosidasa, como es evidente a partir de los nombres de genes correspondientes enumerados en la Tabla A. Dado que la nueva reivindicación 16 (antigua reivindicación anterior 21) depende de la reivindicación 11, esta reivindicación (nueva reivindicación 16) está limitada por referencia a secuencias específicas reivindicadas, esto es, SEQ ID NO: 2 a 4. Por lo tanto, para el solicitante es claro que la nueva reivindicación 16 cumple con el criterio de claridad.

- Manifiesta el examinador que la reivindicación 22 no es clara porque no define todas las características técnicas esenciales del procedimiento reclamado, ya que se refiere a *“una mutación de pérdida de función en una secuencia de ácido nucleico que codifica para alfa-D-galactosidasa”* pero no define cuál es la mutación puntual y solamente menciona la secuencia de la alfa D-galactosidasa nativa.

El solicitante quisiera pedir al examinador que tenga en cuenta que la nueva reivindicación 17 (antigua reivindicación 22) ya se refiere a secuencias objetivo específicas del gen de la alfa D-galactosidasa, a saber, SEQ ID NO: 2 a 4. En vista de los comentarios del Examinador con respecto al tipo de mutación, la nueva reivindicación 17 ahora requiere que *“donde dicha mutación se selecciona de entre el grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel) y una sustitución”*. Por tanto, el solicitante entiende entonces que la objeción ha sido subsanada.

- Menciona el examinador que la reivindicación 24 no es clara porque menciona *"Café de los granos generados de acuerdo con los procedimientos de las reivindicaciones de las reivindicaciones 2 o 22"* pero no es claro si se refiere a la planta como tal o al producto después de tostar y moler los granos. Se sugiere realizar las correcciones correspondientes para dar claridad a la reivindicación y la materia reclamada, mencionando que el café es soluble. Así mismo, si se está refiriendo a un producto, este se estaría definiendo mediante su procedimiento de obtención; sin embargo, un producto solo puede definirse de esta manera cuando es nuevo e inventivo y no puede definirse mediante sus características técnicas esenciales. Dado que este no es el caso, se sugiere reemplazar por las características técnicas esenciales que definen dicho producto. Continúa el examinador mencionado que la expresión *"Café de los granos generados de acuerdo con los procedimientos de las reivindicaciones de las reivindicaciones 2 o 22, que comprende ADN de los granos generados de acuerdo con el método de las reivindicaciones 2 o 22, donde el café está en forma de polvo o donde el café está en forma granulada"* no permite entender a cuál ADN se está refiriendo dado que no es clara en las reivindicaciones cual es la modificación que lleva dicho ADN o si se trata de la secuencia original que codifica para la alfa-D-galactosidasa (SEQ ID NO: 2 a 4). Adicionalmente menciona el examinador que, la reivindicación 24 carece de sustento porque no se evidencia la obtención de un producto de café (ej. Café en polvo o granulado) y no es coherente porque menciona que el café "comprende ADN de los granos...", pero un producto de café no contiene ADN, sino otros componentes (tablas 1 y 2 de la solicitud).

Respecto a las objeciones realizadas por el examinador a la antigua reivindicación 24, las antiguas reivindicaciones 24 y 25 (nuevas reivindicaciones 19 y 20) han sido modificadas cada una para hacer referencia a un *"producto de café"* para que ya no se interprete que estas reivindicaciones están dirigidas a las plantas de café. Dado que las nuevas reivindicaciones modificadas 19 y 20 dependen de las reivindicaciones

anteriores, estas reivindicaciones (reivindicaciones 19 y 20) están limitadas por la referencia a secuencias objetivo específicas del gen de la alfa-D-galactosidasa, esto es, a las SEQ ID NO: 2 a 4.

Con respecto a la objeción del examinador referido a que las secuencias características de ADN se pierden durante el procesamiento, de hecho, hay evidencia de que el ADN puede extraerse de los granos de café procesados. En este sentido, se solicita al Examinador que se refiera a Martellosi et al. (2005), proporcionado adjunto a este memorial de respuesta, lo que indica una amplificación PCR exitosa de café tostado (ver Figuras 2 y 3), así como de café instantáneo (ver Figuras 6 y 7), y los autores concluyen que *"suficiente ADN sobrevive durante los procesos de tostado y los procesos de liofilizado para permitir la extracción exitosa y la posterior amplificación, siempre que se aplique un protocolo adecuado"* (consulte el primer párrafo en "Conclusión" en la página 8435, de Martellosi et al). En consecuencia, sería posible diferenciar los productos de café reivindicados de los productos del estado de la técnica anterior mediante análisis de ADN de rutina.

- Menciona el examinador que la reivindicación 26 no es clara porque menciona "donde la planta no es transgénica" pero esta reivindicación es dependiente de todas las anteriores, incluyendo la reivindicación 5 que menciona que la mutación puede ser por inserción lo cual podría implicar un transgén.

El solicitante ha eliminado la antigua reivindicación 26 y por tanto ha subsanado la posible inconsistencia en el capítulo reivindicatorio.

2. Determinación de Estado de la técnica:

Como resultado del examen de patentabilidad el examinador encontró los siguientes documentos relevantes:

Ítem	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	WO03032713	"Coffee plant with reduced alpha-D-galactosidase activity"	24 de abril de 2003.
D3	Liu, H., et al. Molecular plant.	"CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants"	13 de enero de 2017.

3. Examen de patentabilidad

Novedad:

El examinador inicia el examen de novedad realizando una comparación entre la reivindicación 24 de la presente invención (expediente NC2019/0014435) con D1. Luego de la comparación menciona el examinador que la materia de la reivindicación 24 no es nueva y por tanto la reivindicación dependiente 25 tampoco cumple con el requisito de novedad.

Nivel inventivo:

El examinador inicia el examen de nivel inventivo realizando una comparación entre la reivindicación 1 de la presente invención (expediente NC2019/0014435) con D1 y D3. Luego de esta comparación, el examinador manifiesta que D1 corresponde al estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1.

El examinador manifiesta que, la diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el procedimiento divulgado en D1, consiste en emplear un agente de edición de ADN para introducir un cambio genético en la célula vegetal de café de la especie *C. canephora*.

Manifiesta el examinador que *"No hay ningún efecto técnico asociado a incluir un agente de edición de ADN en el procedimiento de la solicitud, dado que, el*

documento D1 ya proporciona un procedimiento que incluye modificar genéticamente la célula de la planta de café de la especie C. canephora para reducir la actividad de la alfa-D-galactosidasa y mejorar la solubilidad del café (Págs. 1-14 y reivs. 1- 9)" (tomado del oficio No. 15579).

El examinador plantea entonces que, el problema técnico se reduce al siguiente *"¿Cómo modificar el procedimiento conocido en D1 con el fin de proporcionar un procedimiento alternativo?"* (Tomado del oficio N.º 15579).

Manifiesta el examinador que, el incluir un agente para la edición del ADN para *C. canephora*, ya está divulgado en el documento D3. Cita el examinador los siguientes extractos de D3 Pág. 530, Col. Izq, Pág. 530, Cols. Izq y Der y la Fig. 1 para soportar esta afirmación.

Manifiesta el examinador que, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir las herramientas descritas para la edición de genes del D3 en el procedimiento de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Manifiesta el examinador que las reivindicaciones dependientes 2 a 23 y 26 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al procedimiento de la reivindicación 1, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

El solicitante quisiera manifestar su desacuerdo con las objeciones realizadas por el examinador referentes a la novedad y el nivel inventivo de la presente invención.

Argumentos en defensa de la novedad.

En el oficio N° 15579, el examinador objetó que las antiguas reivindicaciones 24 y 25 (nuevas reivindicaciones 19 y 20) no cumplen con el criterio de novedad a la

luz de las enseñanzas de D1. El solicitante quisiera manifiesta su desacuerdo con el análisis de novedad realizado por el examinador, en el sentido de que las nuevas reivindicaciones 19 y 20 están limitadas por referencia a las secuencias objetivo específicas del gen de la alfa-D-galactosidasa, esto es, las SEQ ID NO: 2 a 4, las cuales no se describen en D1. Como se ha manifestado anteriormente con referencia a Martelossi et al. (2005), el ADN característico puede detectarse en productos de café incluso después del procesamiento.

Por lo tanto, para el solicitante es claro que las reivindicaciones modificadas son nuevas.

Argumentos en defensa del nivel inventivo.

Luego del análisis de nivel inventivo el examinador concluye que las reivindicaciones son obvias a la luz de las enseñanzas de D1 en combinación con las enseñanzas de D3. El examinador argumenta que no se muestra ningún efecto técnico en la solicitud tal como se presentó que este asociado con *Coffea canephora* como especie objetivo o con cualquiera de las secuencias específicas (SEQ ID NO: 2 a 4) como secuencias objetivo.

En este sentido, ni D1 ni D3 revelan los genes de alfa-D-galactosidasa de SEQ ID NO: 2 a 4. La alineación que presenta el Examinador en el oficio N° 15579 de SEQ ID NO: 1 de D1 con las SEQ ID NO 4 (98,86 % de identidad), 2 (60,49 % de identidad) y 3 (61,24 % de identidad) de la presente invención se entiende por parte del solicitante, pero se llama la atención sobre el hecho de que los genes de la alfa-D-galactosidasa de las SEQ ID NO: 2 a 4 solo fueron identificados como tales por el Solicitante (ver página 88, líneas 12 a 17, y Figura 3A del capítulo descriptivo tal y como se presentó el 19 de diciembre de 2019).

Además, fue el Solicitante quien luego confirmó la expresión de estos genes en el endospermo del grano de café, enfatizando su función en el procesamiento de polisacáridos en los granos de café (ver página 88, líneas 20 a 23, del capítulo

descriptivo tal y como se presentó el 19 de diciembre de 2019), dicha información no resultaba derivable de D1 o D3. En consecuencia, la persona versada en la materia no habría llegado a la materia actualmente reivindicada a la luz de las enseñanzas de D1 y D3.

Además, independientemente del hecho de que los genes de alfa-D-galactosidasa de SEQ ID NO: 2 a 4 no se enseñan o sugieren en los documentos citados como el estado de la técnica más cercano a la invención (D1 o D3), la persona versada en la materia tampoco habría aplicado fácilmente un enfoque de edición del genoma para suprimir la actividad de la alfa-D-galactosidasa en café, independientemente de la descripción general que se hace en D3. Antes de la fecha de prioridad, según el conocimiento del Solicitante, no se había demostrado una edición de genes exitosa en el café, por lo que no existiría una expectativa razonable de éxito de que la tecnología de edición de ADN pudiera transferirse al sistema del café.

El solicitante, por otro lado, logro con éxito dirigirse como objetivo a los genes de alfa-D-galactosidasa que corresponden a las SEQ ID NO: 2 a 4 (ver página 89, línea 1, página 91, línea 14 y Figuras 4 a 6 del capítulo descriptivo tal y como se presentó el 19 de diciembre de 2019). Incluso si una persona versada en la materia hubiera aplicado la edición del genoma al sistema del café, no habría tenido una expectativa razonable de éxito en la selección de estos genes específicos.

Al menos por estas razones, para el solicitante es claro que las reivindicaciones modificadas cumplen con el criterio de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas de D1 y D3 bien sea tomadas de forma individual o en combinación.

Por al menos estas razones las reivindicaciones que se presentan como respuesta a este oficio cumplen con el criterio de novedad y nivel inventivo frente a los documentos citados del estado del arte (D1 y D3).

Así, se solicita a el examinador que, con base a estos argumentos, reconsidere las objeciones relativas a la novedad y el nivel inventivo de la presente invención.

Por todo lo dicho, solicitamos que la Superintendencia de Industria y Comercio admita las modificaciones que se han facilitado, las cuales no amplían materia y subsanan las objeciones realizadas por el examinador. Asimismo, solicitamos que continúe el trámite con normalidad y se proceda con la concesión del Derecho sobre la Patente de la referencia.

Para efectos de notificaciones, recibiré estas vía internet al correo electrónico claudia.caro@ponsip.com, en la secretaría de esa Dirección y/o en la de la Delegatura de Propiedad Intelectual o en mi oficina de abogados de la Calle 94 A No 11A-32 Oficina 306 de la ciudad de Bogotá.

Agradezco su atención.



CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ

CC No 40.017.374 de Tunja
T.P. No 36.448 del C.S de la J.
Adjunto lo anunciado.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aumento de la capacidad de extracción de sólidos de los granos de café, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 (a) someter una célula vegetal de café a un agente de edición del ADN de un sistema de edición del ADN que corresponde a CRISPR-Cas dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica una alfa-D-galactosidasa para dar como resultado una mutación de pérdida de función en dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicha alfa-D-galactosidasa; y
 - 10 (b) regenerar una planta a partir de la célula vegetal;
donde dicha planta de café es de la especie *Coffea canephora*;
donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la alfa-D-galactosidasa se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-4; y
donde dicha mutación se selecciona de entre el grupo que consiste en una
 - 15 eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel) y una sustitución.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la recolección de los granos de dicha planta.
- 20 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en los que dicha mutación está en forma homocigota.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en los que dicha mutación está en forma heterocigota.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) corresponde a someter a una construcción de ácido nucleico que codifica dicho agente de edición del ADN.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en los que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la alfa-D-galactosidasa es la que se expone en la SEQ ID NO: 4.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en los que dicho agente de edición del ADN se dirige a las coordenadas de un ácido nucleico dentro de los exones 1, 2, 3, 4 y/o 5 de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicha alfa-D-galactosidasa.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que dicho agente de edición del ADN comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 38-41.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que dicho agente de edición del ADN comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-11 y 37.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que dicho agente de edición del ADN se dirige a una pluralidad de dichas secuencias

de ácidos nucleicos que codifican dicha alfa-D-galactosidasa.

11. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de edición del ADN de un sistema de edición del ADN que corresponde a CRISPR-Cas dirigido a la alfa-D-galactosidasa estando
5 unido operativamente a un promotor vegetal del café; donde dicha alfa-D-galactosidasa del café se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-4.
- 10 12. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 11, en los que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la alfa-D-galactosidasa es la que se expone en la SEQ ID NO: 4.
13. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 11 o 12, en los que
15 dicho agente de edición del ADN se dirige a las coordenadas de un ácido nucleico dentro de los exones 1, 2, 3, 4 y/o 5 de una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha alfa-D-galactosidasa.
14. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las
20 reivindicaciones 11-13, en la que dicho agente de edición del ADN comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 38-41.
15. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las
25 reivindicaciones 11-13, en los que dicho agente de edición del ADN comprende

una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-11 y 37.

16. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en los que dicho agente de edición del ADN se dirige a una pluralidad de dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicha alfa-D-galactosidasa.

17. Un procedimiento de producción de granos de café, comprendiendo el procedimiento:

- (a) cultivar la planta de café, o parte de la planta, que comprende un genoma que presenta una mutación de pérdida de función en una secuencia de ácido nucleico que codifica para alfa-D-galactosidasa, donde la planta no es transgénica; y
- (b) recolectar los granos de la planta.
- (c) someter los granos de la planta a extracción y deshidratación; y donde dicha planta de café es de la especie *Coffea canephora*; donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la alfa-D-galactosidasa se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-4; y donde dicha mutación se selecciona de entre el grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel) y una sustitución.

18. El método de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente someter los granos a tueste.

19. Un producto de café producido de los granos generados de acuerdo con los procedimientos de las reivindicaciones de las reivindicaciones 2 o 17, que comprende ADN de los granos generados de acuerdo con el método de las reivindicaciones 2 o 17, donde el producto de café está en forma de polvo o donde
5 el café está en forma granulada.

20. El producto de café de acuerdo con la reivindicación 19, donde el producto de café está descafeinado.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2023/0001357
Recibo: 23-148820
Fecha: 08/02/2023

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ
CC: 40.017.374
Pago PSE No: 790844
CUS: 1907696941

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente PCT NC2019/0014435

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 196,000	\$ 196,000
TOTAL					\$ 196,000

ARTICLES

DNA Extraction and Analysis from Processed Coffee Beans

CHIARA MARTELLOSI,^{†,‡} EMILY J. TAYLOR,[†] DAVID LEE,[†]
GIORGIO GRAZIOSI,^{*,‡} AND PAOLO DONINI[†]NIAB, Huntingdon Road, CB3 0LE Cambridge, United Kingdom, and Università degli Studi di
Trieste, piazzale Europa 1, 34127 Trieste, Italy

The authenticity of coffee is an important issue for both producers and consumers. Premium Arabica material is especially prone to being adulterated, and a number of different techniques have been employed to determine the quality of both roasted and instant coffee. Currently, assessment of coffee authenticity relies on chemical methods which can discriminate between coffee species, but not varieties. Several genetic markers are available for assessing coffee origin, but their suitability to testing commercial coffee is limited by the ability to extract DNA from highly processed beans. In this paper, we demonstrate that PCR-grade DNA may be obtained from roasted beans and even instant coffee. This would allow analysis of commercial samples, provided that suitable markers for species/variety identification are found.

KEYWORDS: Coffee; DNA extraction; PCR; authenticity

INTRODUCTION

World coffee production relies on just two species, *Coffea canephora* (commercially known as “Robusta”) and *C. arabica* (“Arabica”). The latter alone accounts for 70% of the market: the former is usually employed in blends, for espresso or instant coffee. Arabica coffee is associated with better quality products and is sold at a higher price; even within this species some varieties, such as Kona or Jamaican Blue Mountain, are specially prized and command a premium.

“Green”, unroasted coffee may be adulterated by producers with the addition of husks, low-rate varieties, and Robusta beans. Also retailers may add inferior grade or even extraneous material such as chicory root, acorns, or barley to create sophisticated products, especially when roasted beans are sold loose after grinding; nowadays, the subject is aggravated by the possibility that the material may derive from genetically modified plants. It has also been reported that fraudulent retailers have traded green Arabica beans from South America labeled as premium Hawaii Kona coffee (1). The presence of husks or alien species in coffee may be revealed through chromatographic (2) or spectroscopic techniques (3), and D-5-avenasterol is key evidence for the presence of Robusta material (4), but adulteration from lower grade Arabica varieties is more difficult to identify.

The use of DNA molecular markers to identify species or varieties within a blend is a way to guarantee a product of

constant quality and prevent adulteration with extraneous material or low-grade varieties. Molecular markers such as microsatellites have been employed with good results for the characterization of *Coffea* species, enabling the discrimination between Robusta and Arabica and even among different Arabica varieties (5).

The main problem with using diagnostic DNA sequences for commercial coffee testing lies in the extent of its degradation during processing. Nucleic acids decompose rapidly at high temperatures such as those reached during roasting (up to 245 °C); therefore, the DNA extracted from roasted beans is fragmented and denatured, making further analysis difficult. Other chemical alterations, such as depurination and nicking, make the DNA unsuitable for analysis, even though it may appear intact when visualized in a nondenaturing agarose gel. Furthermore, several compounds that are present in the seed or originate during roasting are copurified together with the DNA in the extraction process and may hinder the PCR assay; in particular, polyphenols and acidic polysaccharides are known to inhibit the Taq polymerase (6). During roasting, sugars in the bean break down to more soluble compounds (7), and these are then found in the final extract.

We focused on PCR-amplification techniques because these methods are generally sensitive and reproducible, capable of providing results even when testing scarce amounts of degraded DNA. To minimize the deleterious effects of DNA degradation, we analyzed chloroplast sequences, which are present in high copy number, other highly repetitive genomic sequences, and

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: graziosi@units.it.
Phone: +39 040 811836. Fax: +39 040 810860.

[†] NIAB.

[‡] Università degli Studi di Trieste.

Table 1. Extraction of DNA from Green and Processed Coffee with Different Procedures

kit/protocol	starting material mass	yield (green beans) (ng)	PCR	yield (roasted beans) (ng)	PCR	yield (instant coffee) (ng)	PCR
ClonTech NucleoSpin Plant Kit	50 mg	250	yes	~80	yes		
Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit	50 mg	120	no	none	no		
Promega Wizard Magnetic DNA Purification Kit for Food (plus GeneClean II purification)	1 g	40–100	yes	~100 (purified)	yes	~100	yes
Qiagen DNeasy	100 mg	250	yes	none			
Qiagen Mixer Mill	50 mg	250	yes	none			
Qiagen Stool Kit	220 mg	250	no	none			
ClonTech NucleoSpin Food Kit	50 mg	NA		~80	no		
CTAB	1 g	200–400	yes	~100	no		

short microsatellite markers, therefore increasing the chance of obtaining amplicons from intact, full-length copies of the target fragments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES AND RESULTS

All the samples used for DNA extractions were kindly supplied by Kraft Foods. These consisted of 25 samples of green coffee beans, 3 samples of Arabica beans roasted to 8.4, 10.3, and 18.8 *L*, 3 samples of Robusta roasted to 10.2, 11, and 19.1 *L*, (a higher *L* value corresponds to a lower degree of roasting), and 6 samples of instant coffee from different stages of the production process.

Green Coffee. Beans were ground to a fine powder in a fixed-speed Moulinex Super Junior coffee grinder. To minimize binding of phenolic inhibitors to DNA, 4% of either polyvinylpyrrolidone (PVPP) or activated charcoal was added to the beans before grinding (8, 9).

Several commercially available kits provided suitable yields of high-molecular-weight genomic DNA, although not always amplifiable (see **Table 1** for an overview of the results). Because of the rapidity of the procedure, after the preliminary assays, the ClonTech NucleoSpin Plant Kit protocol was routinely used following the manufacturer's instructions with the following modification: after the initial incubation step at 65 °C, 5 μ L of 1 U/ μ L RNase A was added to each tube, and the samples were incubated for 15 min at room temperature (rt).

Where a higher yield was required, a CTAB extraction was performed as follows: 1 g of ground beans was incubated at 65 °C in a sterile Falcon 15 mL tube with 3 mL of freshly stirred CTAB extraction buffer (1.5 M NaCl, 0.12 M sorbitol, 1% PVPP, 0.08% CTAB, 1% *N*-lauroylsarcosine, 5 mM EDTA, pH 8.0) and then allowed to cool to rt; after addition of 1 mL of 5 M potassium acetate, the tubes were incubated overnight at –20 °C, thawed under ice, and spun at 4000*g* for 15 min. A 1 mL aliquot of supernatant was transferred to a sterile 2 mL microcentrifuge tube before addition of 5 μ L of 1 U/ μ L RNase A. Samples were incubated at 37 °C for 15 min and extracted with 600 μ L of chloroform/isoamyl alcohol (24:1), followed by centrifugation at 4300*g* for 15 min. The aqueous phase was transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube, and 800 μ L of 100% 2-propanol was added. Samples were incubated at room temperature for 30 min and spun at 4300*g* for 15 min. Supernatant was discarded and the pellet washed once with 70% ethanol and resuspended in 50 μ L of TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8). At this stage, samples showing residual traces of polysaccharides were subjected to an additional centrifugation at 13200*g* for 10 min on a benchtop centrifuge, and the supernatant was transferred to a fresh tube. All samples were stored at –20 °C.

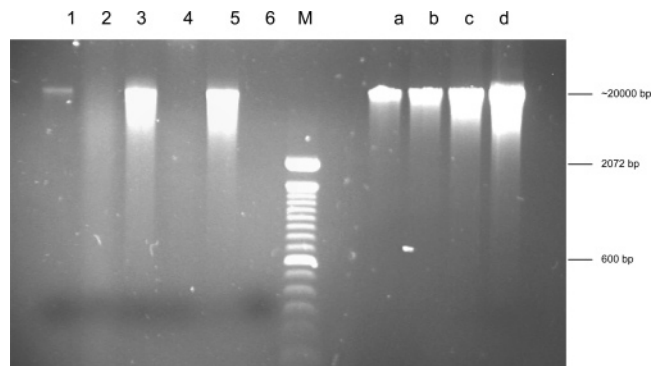


Figure 1. Extraction of DNA from green and roasted coffee beans. The final eluate/resuspended pellet was extracted with different protocols (10 μ L each). Key: lanes 1 and 2, CTAB method on green and roasted beans; lanes 3 and 4, Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit on green and roasted beans; lanes 5 and 6, ClonTech NucleoSpin Plant Kit on green and roasted beans; lane M, 100 bp marker; lanes a–d, 6.25, 12.5, 25, and 50 ng of calf thymus DNA, respectively.

Roasted Coffee. Beans were ground as previously described in the presence of either 4% PVPP or activated charcoal. Several kits for DNA extraction were tested, most employing DNA-binding columns, the exception being Promega Wizard Magnetic DNA Purification Kits, which employ a magnetic bead capture system. The CTAB extraction protocol described above was also tested.

To determine DNA concentration and quality, 10 μ L of the final eluate/resuspended pellets was electrophoresed on an 0.8% agarose gel containing 0.3 mg/mL ethidium bromide (EtBr). DNA from roasted beans was visible as a faint smear of ca. 200 bp; a blue smear appeared in the 20–2 kb range when the CTAB protocol was used (see **Figure 1**).

Sterical interaction of degraded DNA with EtBr and other dyes, such as Hoechst 33258, may be suboptimal and result in lesser fluorescence, affecting both visual and spectrophotometric quantitation. Values thus obtained, although approximate, were consistent and were used as references to compare the performance of different extraction methods and to assess the quantity of template in PCR reactions.

After the initial evaluation phase, DNA extraction for analytical purposes was routinely performed on 0.3 g of material with ClonTech NucleoSpin columns, following the manufacturer's protocol. DNA was eluted in 50 μ L of the kit's CE buffer. This method took less than 3 h of hands-on time, and yielded ~0.1 μ g of total DNA.

For applications requiring DNA of higher purity, such as amplification of low-copy-number sequences, extractions were performed from 1 g of starting material with the Wizard magnetic food kit, eluting the magnetic particles in 400 μ L of

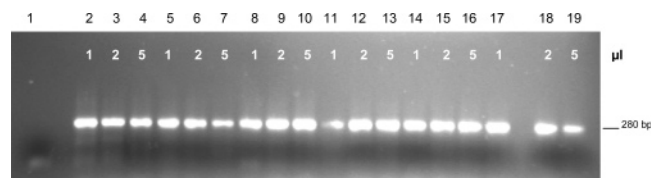


Figure 2. PCR on DNA extracted from roasted coffee with the Promega Wizard Magnetic DNA Purification Kit for Food followed by purification with Bio101 GeneClean II. Key: lane 1, negative control; lanes 2–4, Arabica roasted at 8.4 L; lanes 5–7, Arabica roasted at 10.3 L; lanes 8–10, Arabica roasted at 18.8 L; lanes 11–13, Robusta roasted at 10.2 L; lanes 14–16, Robusta roasted at 11 L; lanes 17–19, Robusta roasted at 19.1 L.

H₂O in the final step. The eluate was further purified with Bio101 GeneClean II following the manufacturer's protocol, and the DNA was eluted in 20 μ L of H₂O. Sterile PCR-grade water (Sigma) was used for all applications.

To assess PCR performance, we amplified a 210 bp fragment from a coffee chloroplast sequence for the *trnL* (UAA)–*trnF* (GAA) intergenic spacer, obtained from the NCBI sequence database (www.ncbi.nlm.nih.gov, accession no. U93387). Higher plants have a large number of chloroplasts per cell, and therefore, multiple copies of the chloroplast genome are present for each nuclear genome; hence, although DNA is degraded during roasting, enough target copies may remain intact for the PCR to succeed.

Volumes of 1, 2, and 5 μ L of the final eluate (corresponding to ~5, 10, and 25 ng of DNA, respectively) were amplified in 25 μ L of 10 mM Tris–HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3 at 20 °C, 2.0 μ M dNTPs, 2.5% DMSO, 0.025 U/ μ L Taq polymerase (Roche), and a 1.0 μ M concentration of each primer. The forward primer was 5'-AAT CGA TCT GGA CGG AAA AG-3' and the reverse primer 5'-AAA GAA GGA AAG GGG ATT ACA A-3'. The PCR program was 94 °C for 3 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s–55 °C for 30 s–72 °C for 1 min and by 72 °C for 5 min. The same conditions, except for the annealing temperature of 45 °C, were used to amplify a 280 bp fragment from a conserved domain of the reverse transcriptase, representative of a high-copy-number genomic sequence (10). The forward primer was 5'-GGA ATT CGA YGT NAA RAC NGC NTT YYT-3' and the reverse primer 5'-GGG ATC CAY RTC RTC NAC RTA NAR NA-3'.

In our experience, PCR performance of DNA extracted with the Wizard magnetic food kit followed by purification with GeneClean II showed little or no variation with regard to the quantity of template (see **Figure 2**). PCR amplification of DNA extracted with ClonTech NucleoSpin columns, instead, depended on the quantity of the template to a greater extent. Higher L values and greater quantity of template resulted in stronger bands: this was interpreted as a consequence of DNA degradation at high temperature. Amplification from Robusta samples was more efficient for smaller quantities of template and failed occasionally with larger volumes of eluate; this behavior was more evident in mildly roasted samples (**Figure 3**). To assess whether poor PCR performance was due to the residual presence of Taq inhibitors, we added 1, 2, and 5 μ L of eluate to a control reaction, using M13 forward and reverse universal primers to amplify a 600 bp insert cloned in pUC19. PCR inhibition alone did not explain the behavior of the 10.2 Robusta sample, and DNA degradation may have occurred as well (**Figure 4**).

Although chloroplast DNA is present in high copy number in the total DNA extracted from beans, it is highly conserved and unlikely to show intraspecific polymorphism within *C.*

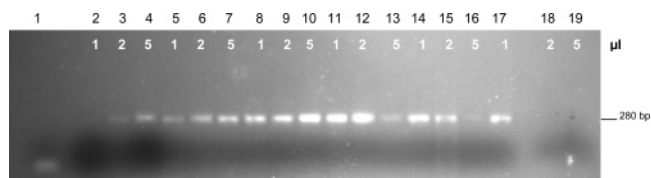


Figure 3. PCR on DNA extracted from roasted coffee with ClonTech NucleoSpin columns. Key: lane 1, negative control; lanes 2–4, Arabica roasted at 8.4 L; lanes 5–7, Arabica roasted at 10.3 L; lanes 8–10, Arabica roasted at 18.8 L; lanes 11–13, Robusta roasted at 10.2 L; lanes 14–16, Robusta roasted at 11 L; lanes 17–19, Robusta roasted at 19.1 L.

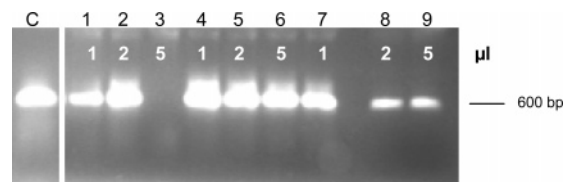


Figure 4. Inhibition test on a control PCR (ClonTech NucleoSpin columns). Key: lane C, positive control (600 bp PCR product from a cloned insert); lanes 1–3, Robusta roasted at 10.2 L; lanes 4–6, Robusta roasted at 11 L; lanes 7–9, Robusta roasted at 19.1 L.

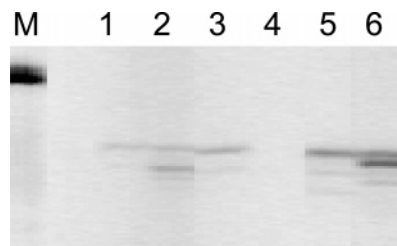


Figure 5. Microsatellite amplification from roasted coffee. Key: lane M, 106 bp PCR product (molecular weight marker); lane 1, Robusta roasted at 10.2 L; lane 2, Robusta roasted at 11 L; lane 3, Robusta roasted at 19.1 L; lane 4, Arabica roasted at 8.4 L; lane 5, Arabica roasted at 10.3 L; lane 6, Arabica roasted at 18.8 L.

arabica. Hypervariable sequences, such as microsatellites, would be better suited for variety discrimination purposes; however, single-locus amplification strategies find a limitation in the quantity of available target DNA. To assess PCR performance of low-copy-number sequences, a short coffee genomic DNA fragment (~94 bp) containing a microsatellite motif was also amplified using 5 μ L of eluate in 25 μ L of 10 mM Tris–HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3 at 20 °C, 2.0 μ M dNTPs, 2.5% DMSO, 0.025 U/ μ L Taq Gold polymerase (Roche), 0.1 μ M tailed forward primer, 0.5 μ M labeled tail, and 0.5 μ M reverse primer. The primer set used was CMA068, obtained from the site www.coffeedna.net (sequences are available upon subscription). The PCR program consisted of 45 cycles of 94 °C for 30 s–55 °C for 30 s–72 °C for 1 min and a 72 °C for 5 min final elongation step. The primers used were designed for use in conjunction with a labeled universal tail that allowed visualization of the PCR products on a fluorescence or infrared genotyper, but did not otherwise affect amplification. Only DNA extracted with the Wizard magnetic food kit followed by purification with GeneClean II was used for the experiment. PCR products were electrophoresed in a 6% polyacrylamide gel on an LI-COR infrared automated genotyper (**Figure 5**); PCR from one highly roasted Arabica sample failed, possibly because of extreme template degradation.

Instant Coffee. The material did not require previous grinding; 1 g of instant coffee was weighed into a sterile tube and DNA extracted using the Wizard Magnetic DNA Purifica-

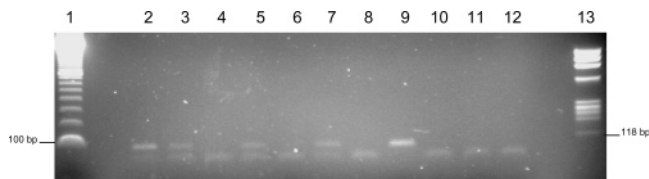


Figure 6. PCR on DNA extracted from instant coffee (PTC-100 thermal cycler). Key: lane 1, 100 bp marker; lanes 2–6, five different samples of instant coffee (a–e); lane 7, Kenco instant coffee; lane 8, negative control (PCR water); lane 9, positive control (genomic DNA from green coffee beans); lane 10, negative control (extraction elution buffer); lane 11, negative control (purification elution buffer); lane 12, aspecific amplification control (genomic DNA from oilseed rape); lane 13, Φ X174/Hae III marker.

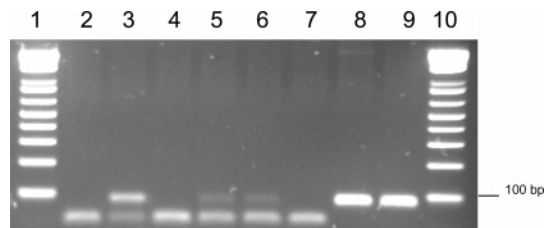


Figure 7. PCR on DNA extracted from instant coffee (Roche LightCycler). Key: lanes 1 and 10, 100 bp marker; lane 2, negative control (PCR water); lanes 3–6, four different samples of instant coffee (a, c–e); lane 7, Kenco instant coffee; lanes 8 and 9, positive control (*Coffea* genomic DNA from the leaf).

tion System for Food followed by purification with GeneClean II, as described for roasted coffee. Although 10 μ L of DNA was not visible on a 2% agarose gel, measurements on a fluorimeter gave readings between 4 and 11 ng/ μ L. These readings are to be considered as indicative, for the reasons discussed. A PCR product of expected size was obtained from 5 μ L of eluate, amplified on a PTC-100 thermal cycler in 25 μ L of 10 mM Tris–HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3 at 20 °C, 2.0 μ M dNTPs, 2.5% DMSO, 0.025 U/ μ L Taq Gold polymerase (Roche), and a 0.5 μ M concentration of each primer. Primers were for an 86 bp fragment from the same *trnL*–*trnF* intergenic chloroplastic spacer described earlier. The forward primer was 5'-TTA TCC TAT CCC CCT TTC GTT A-3' and the reverse primer 5'-GGG CTT TTC CGT CCA GAT-3'; the PCR program was 40 cycles of 95 °C for 30 s–55 °C for 30 s–72 °C for 1 min (**Figure 6**).

Real-time PCR was also carried out on a Roche LightCycler in 20 μ L of 1 $\times$ BioGene PCR master mix–3 mM MgCl₂ (cat. no. PCRM012), a 0.25 μ M concentration of each primer, and 5% SYBR Green I solution (1% in dimethyl sulfoxide, DMSO); the PCR program was 40 cycles of 95 °C for 5 s–55 °C for 5 s–72 °C for 5 s. Electrophoresis of PCR products is shown in **Figure 7**. Results are comparable, although sample e was amplified on the LightCycler but not on the PTC-100; the opposite occurred for Kenco instant coffee. A description of the samples was not available to help us relate PCR performance with the type of processing to which the material tested was subjected during its formulation.

Conclusion. It is demonstrated that enough DNA survives during roasting and freeze-drying processes to enable successful extraction and subsequent amplification, provided that a suitable protocol is applied. In our experience, procedures requiring a final precipitation step allowed for a higher yield of DNA from both green and roasted beans; however, DNA thus obtained was not always amplifiable, presumably because of inhibitors coprecipitating with the DNA. Resin column methods provided

DNA of a higher grade, although the yield was generally lower. Both activated charcoal and PVPP were shown to be efficient at preventing the binding of inhibitors to DNA during the grinding step; although the yield was lower, PCR performance improved.

Among the kits tested on roasted beans, the ClonTech NucleoSpin Plant Kit yielded readily amplifiable DNA from most samples; the Promega Wizard Magnetic DNA Purification Kit for Food required further purification with a DNA-binding resin to allow PCR amplification. However, this additional step resulted in a better PCR performance than was obtained using the NucleoSpin procedure. The Nucleon Phytopure plant DNA extraction kit and the CTAB protocol yielded about 250 ng of DNA, but none of the samples could be amplified, possibly due to the high amount of sugars contaminating the final extract. In our experience, the other kits tested did not yield detectable amounts of DNA from processed beans.

Suitability for amplification was shown to depend essentially on the nature of the starting material. Both degradation of DNA and likely the presence of PCR-inhibiting contaminants were observed, although it was possible to obtain successful amplification from all roasted samples simply by adjusting the quantity of template. It is however recommended that DNA extracted from roasted beans is thoroughly purified before being used for PCR, especially in applications that require a large quantity of template, such as low-copy-number sequences.

Successful amplification of DNA extracted from instant coffee was obtained for some of the tested samples, provided that short, multiple-copy sequences are chosen as a template. One sample out of six never yielded amplifiable DNA.

Given the low amount of DNA extracted from processed coffee, contaminant DNA is likely to outcompete the proper template in the PCR reaction, especially when degenerated or “universal” primers are employed. It is strongly recommended that special care is taken during DNA extraction and PCR setup and that negative controls are always included to test for contamination. Several precautions such as the use of filter pipet tips, a “closed cap” reaction like that employed on the LightCycler platform, or the uracyl *N*-glycosylase (UNG) method (11) can be implemented to prevent the possibility of contamination and carryover from earlier PCR experiments.

These extraction methods will enable researchers to assess the authenticity of coffee varieties once suitable markers are found, allowing determination of the percentage of Robusta in blends, or reveal frauds such as mentioned earlier. The same considerations and procedures may apply, with due modifications, to other foods and products that undergo a roasting process, such as, although not limited to, peanuts, cocoa beans, tobacco, and black tea.

ACKNOWLEDGMENT

Dr. Simon Penson, Kraft Foods, is thanked for supplying the coffee material.

LITERATURE CITED

- Meadows, M. California man convicted of brewing a coffee scam. *FDA Consum.* **2001**, 35, 6.
- Prodolliet, J.; Bruehlhart, M.; Blanc, M. B.; Leloup, V.; Cherix, G.; Donnelly, C. M.; Viani, R. Adulteration of soluble coffee with coffee husks and parchments. *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 761–7.
- Fontes, A. S.; Bento, A. C.; Miranda, L. C. M.; Baesso, M. L. Thermal lens evaluation of the presence of adulterants in brewed coffee. *Anal. Sci.* **2001**, 17, s526–9.

- (4) Valdenebro, M. S.; León-Camacho, M.; Pablos, F.; González, A. G.; Martín, M. J. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterolic content. *Analyst* **1999**, *124*, 999–1002.
 - (5) Anthony, F.; Combes, M. C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G.; Lashermes, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *104*, 894–900.
 - (6) Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3741–51.
 - (7) Redgwell, R. J.; Trovato, V.; Curti, D.; Fischer, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 421–31.
 - (8) Brunner, I.; Brodbeck, S.; Buchler, U.; Sperisen, C. Molecular identification of fine roots of trees from the Alps: reliable and fast DNA extraction and PCR-RFLP analyses of plastid DNA. *Mol. Ecol.* **2001**, *10*, 2079–87.
 - (9) Bi, I. V.; Harvengt, L.; Chandeler, A.; Mergeai, G.; du Jardin, P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed.* **1996**, *115*, 205–206.
 - (10) Flavell, A. J.; Smith, D. B.; Kumar, A. Extreme heterogeneity of Ty1-copia group retrotransposons in plants. *Mol. Gen. Genet.* **1992**, *231*, 233–242.
 - (11) Longo, M. C.; Berninger, M. S.; Hartley, J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **1990**, *93* (1), 125–8.
-

Received for review April 6, 2005. Revised manuscript received July 22, 2005. Accepted August 2, 2005. This research was partially funded through a European Social Fund grant (SE 200115359003) with the assistance of the ENAIP Italian institute for professional instruction.

JF050776P