

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



01 35948

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 01035948 00000000

Folios: 37

Fecha (AMB): 2001-05-08 15:10:40

Trámite: 1 002 INVENTOS D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTE

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: 1) Corporación BIONECA, 2) Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT Dirección: 1 y 2: Km 17 recta Cali-Palmira Teléfono: 1 y 2: 445-0000 Fax: 1 y 2: 445-0073 E-mail: Domicilio: 1 y 2: Palmira - Valle	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☒ C.E. ☐ Otro ☐ Número 1) 805.001.728-8 2) 800.034.585-2
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: Germán Arias Jaramillo Dirección: Km 17 recta Cali-Palmira, CIAT Teléfono: 445-0000 Fax: 445-0073 E-mail: g.arias@cgiar.org	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☒ Número 14.993.364 TP 18.842
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Ver hoja complementaria (Fol 3) Dirección: Teléfono: Fax: E-mail: Domicilio	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ Otro ☐ C.E. ☐ Número

5 Título (64) Proceso para la Propagación Clonal in vitro de Plantas de Guinebano (Annona muricata L.), empleando la Microinjercción Cíclica.

6 Clasificación Internacional (51) A01H 4/00

7 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☐ NO ☒	_____ _____ _____	_____ _____ _____	_____ _____ _____

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los: Una vez concluido el examen de forma.
 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐

9 Comprobante de pago No. 22565 **Fecha** _____

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

CÓMO DILIGENCIAR EL FORMULARIO

- Si faltara espacio en algún recuadro de este impreso, utilice hojas complementarias.
 - Los espacios sombreados corresponden a los requisitos mínimos que deben cumplirse para obtener fecha de presentación de la solicitud.
 - Si alguna casilla del formulario no fuera cubierta, se cruzará una línea oblicua.
1. **Solicitud de:** Únicamente se acepta una opción por cada solicitud. Debe marcarse en la casilla correspondiente si se trata de una solicitud de registro de Patente de Invención o Patente de Modelo de Utilidad.
 2. **Solicitante:** Es la persona natural o jurídica que está solicitando el registro. Debe indicarse: nombre, dirección, teléfono, fax o E-mail.
Identificación: Corresponde a la indicación del documento de identidad del solicitante, discriminando en la casilla correspondiente, si se trata de C.C. (cédula de ciudadanía), NIT (Número de Identificación Tributaria), C.E. (Cédula de Extranjería); u Otro (en caso de que la identificación del solicitante corresponda a un documento diferente a los anteriormente mencionados.)
Domicilio: Indicar el país o estado, departamento y ciudad.
 3. **Representante o apoderado:** En este espacio debe indicar el nombre del representante legal cuando se trate de una persona jurídica si no se está actuando a través de apoderado y deberá acreditarse tal calidad. Si se actúa a través de apoderado, debe indicarse el nombre del abogado que adelantará la actuación administrativa y anexas poder. Si la solicitud la adelanta una persona natural sin apoderado, no debe diligenciarse esta casilla.
 4. **Inventor:** Nombre y Apellido. (Debe ser una persona natural).
 5. **Título de la invención:** Es el nombre de la invención. Debe definir en forma breve y precisa el objetivo de la invención de tal manera que permita ubicar al lector en el campo tecnológico a que pertenece la invención. El título debe estar acorde con la descripción y reivindicaciones, no debe referirse a marcas ni nombres comerciales.
 6. **Clasificación Internacional:** Este espacio se deja en blanco para ser llenado por la entidad.
 7. **Prioridad:** Si el solicitante ha presentado inicialmente una solicitud en otro país para este mismo objeto, puede reclamar o reivindicar prioridad de esta solicitud, siempre y cuando la presentación se haga dentro del año siguiente a la primera presentación.
 8. Indicar el tiempo en el que se desea que se publique la solicitud.
 9. **Comprobante de pago:** Referenciar el número y fecha del recibo de pago de la tasa establecida. Este comprobante deberá anexarse.
 10. **Anexos:** Deben marcarse con una X las casillas correspondientes a los documentos que acompañarán la solicitud. Para el diligenciamiento ver revés de la siguiente hoja.
 11. **Firma:** Si se actúa a través de abogado la firma deberá ser la del apoderado; si actúa directamente una persona jurídica la firma deberá ser la de su representante legal y si actúa directamente una persona natural ésta deberá firmar la solicitud.

IMPORTANTE:

Si no es especialista en la materia, le recomendamos:

Consultar la normatividad relacionada con este trámite en www.sic.gov.co o en la Biblioteca de la SIC, carrera 13 No. 27-00 piso 5 de lunes a viernes de 8:30 a.m. a 5:00 p.m. jornada continua.

Leer detenidamente los folletos y los instructivos para el diligenciamiento de los formularios.

Una vez radicada la solicitud, informarse permanentemente sobre el estado de su trámite y, si es del caso, contestar dentro del término los requerimientos notificados según las disposiciones legales vigentes.

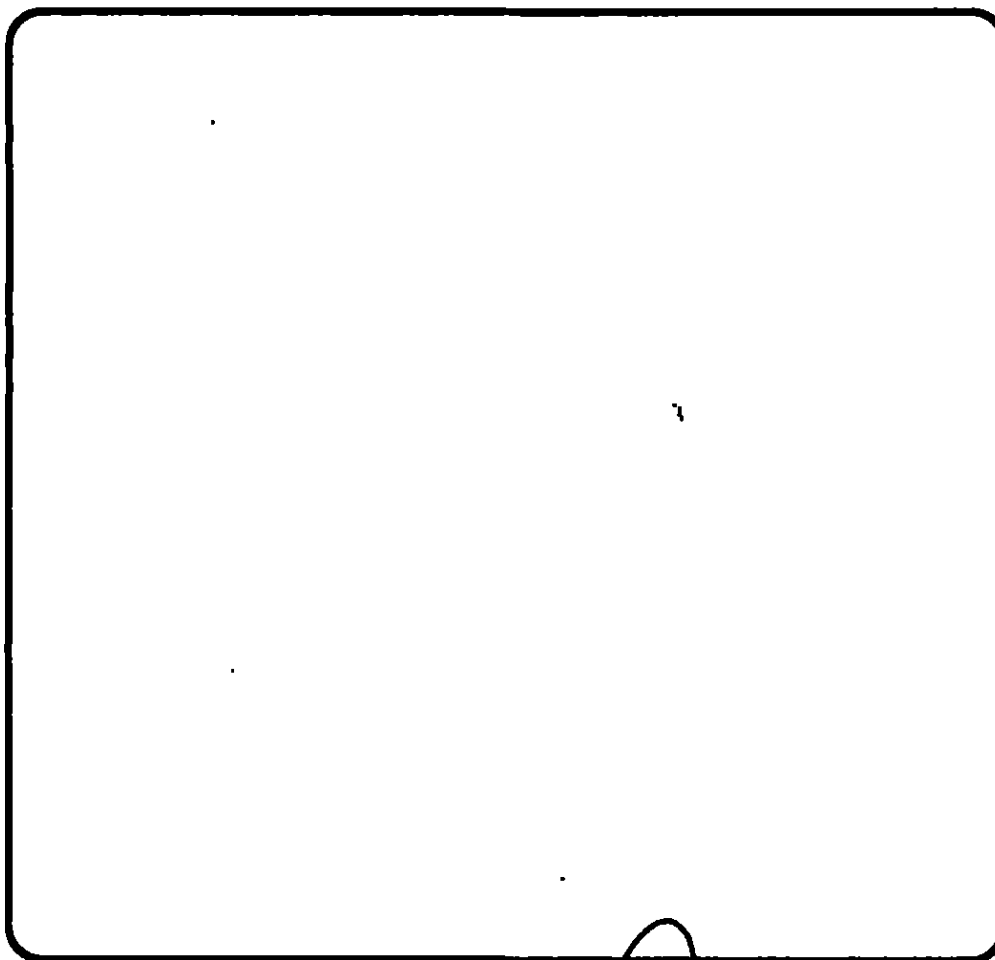
ANEXOS

10

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ 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.
- ☒ Descripción de la invención.
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☒ 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
- ☐ Arte final 12x12.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

NOMBRE: GERMAN ATIAS JARAMILLO

FIRMA: C.C. 14.993.364 T.P.18.842

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

CÓMO PRESENTAR LOS ANEXOS

10. **Dibujos, planos y figuras.** Los dibujos, planos, figuras y representaciones gráficas tienen como finalidad contribuir a una mejor comprensión y divulgación de la invención, por lo tanto deberán tener ciertas características:
- a) Deben tener una relación directa con la descripción.
 - b) Deben permitir visualizar las formas de ejecución descritas.
 - c) La relación entre la descripción y los dibujos se debe hacer por medio de signos de referencia que se encuentren en ambos elementos y guarden una correspondencia.
 - d) Si dentro de la descripción han sido mencionadas algunas figuras necesariamente deben ser incluidas.
 - e) No deben incluirse figuras o dibujos que no se encuentran descritos.
 - f) No deben ser realizados a mano alzada.
 - g) No deben aparecer símbolos o números no mencionados en la descripción.
 - h) No deben incluir textos o letreros.

Los diagramas esquemáticos y de flujo así como las fórmulas químicas o matemáticas que no sean mecanografiadas o impresas dentro del texto de la descripción, se consideran dibujos.

Las gráficas, figuras y dibujos de que trata la Decisión 486, deberán ser elaboradas siguiendo las reglas del dibujo técnico con tinta negra indeleble, numeradas individual y consecutivamente, y presentadas exclusivamente en papel tamaño oficio por una sola cara, sin la inclusión de marcos en su contorno.

Unidad de invención. Cuando un grupo de invenciones es reivindicado en una misma solicitud, el requisito de unidad de invención de conformidad con el artículo 25 de la Decisión 486, se cumplirá sólo si existe entre estas invenciones una relación técnica especial que contribuye a enlazar como un todo el objeto de la invención, con características que sólo pueden ser obtenidas en su conjunto.

Descripción. Para que la descripción divulgue la invención de manera clara y completa para su comprensión deben utilizarse términos técnicos reconocidos en el ámbito técnico correspondiente, si son términos técnicos poco conocidos se deben definir correctamente.

En la descripción no será adecuado el uso de nombres propios o marcas registradas o similares para designar productos.

Solicitudes biotecnológicas. En relación con las solicitudes de patentes en áreas biotecnológicas que se refieren a secuencias de nucleótidos o aminoácidos, la solicitud debe contener una lista de éstas, la cual debe presentarse de manera separada a la descripción y llevar el título "LISTADO DE SECUENCIAS". A cada secuencia divulgada se le asignará un número de identificación descrito como "SEQ ID NO." (Estándares de presentación de listados de secuencias de aminoácidos. Circular PCT 633/PCIP12314, Noviembre 12 de 1997 OMPI). El número de secuencias deberá indicarse en el listado.

En la descripción y en las reivindicaciones, las secuencias se indicarán por su número de identificación.

Las secuencias corresponderán a una secuencia de nucleótidos, una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos junto con su correspondiente secuencia de aminoácidos según sea el objeto de la invención.

Capítulo Reivindicatorio. Las reivindicaciones deben ir numeradas consecutivamente en números arábigos. Para mayor claridad, las reivindicaciones deben constar de dos partes: Un preámbulo y una parte característica. El preámbulo define el objeto de la invención y sus características técnicas, indicando aquello que forma parte del estado de la técnica. La segunda parte, se refiere a las características técnicas del producto o procedimiento que se desea proteger y debe ir precedida de la expresión "caracterizada por" u otra similar.

Una reivindicación independiente debe contener todas las características esenciales de la invención. Toda reivindicación independiente puede ir seguida de una o más reivindicaciones dependientes que hacen referencia a los modos concretos de realización de la invención.

Una reivindicación dependiente contiene todos los elementos de la reivindicación de la que depende y debe hacer referencia a dicha reivindicación y precisar a continuación las características técnicas adicionales que se quieren proteger.

Aun cuando las reivindicaciones deben ser congruentes con la descripción, no es adecuado hacer referencias a la descripción y a los dibujos, si los hubiere, a menos que sea absolutamente necesario. No obstante, con el fin de dar claridad a las reivindicaciones las referencias de los dibujos deberán ir entre paréntesis.

Con el fin de definir la materia que se desea proteger mediante la patente, las reivindicaciones deben ser claras y concisas, no deben definir la invención mediante los resultados que se quieren obtener, y no deberán contener expresiones ajenas al propósito de fijar las limitaciones del privilegio que se desea obtener, ni opiniones personales de tipo comparativo tales como "más ventajoso que" o "más económico que".

Cuando la invención sea un producto químico debe definirse por su fórmula química.

11. **Figura Característica:** Para efecto de la publicación, los dibujos que sean necesarios deberán presentarse en dos ejemplares de tamaño de 12x12 cm., cumpliendo con las condiciones para ser reproducidos por medio de scanner o ser digitalizados para su correspondiente publicación.

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

"Proceso para la Propagación Clonal *in vitro* de Plantas de Guanábano (*Annona muricata* L.), empleando la Microinjertación Cíclica"

HOJA COMPLEMENTARIA AL FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

INVENTORES (72)

Nombre	Dirección	Teléfono	Fax	Domicilio	Identificación
ALVARO MEJIA	Av 4BN 52N-76	445-0000	445-0073	Cali	19.405.402
NELSON ROYERO	Diagonal 24 A-T 11-60, 504A	445-0000	445-0073	Cali	10.486.967
JORGE CABRA	Cra. 68 13B-61, 1004A	445-0000	445-0073	Cali	79.347.400
WILLIAM ROCA	Calle Mecánicos # 12, La Riviera, La Molina	445-0000	445-0073	Lima, Perú	Ppte. Peruano 0320696

Corporación BIOTEC
y
Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT

PATENTE

Título: Proceso para la propagación clonal *in vitro* de plantas de guanábano (*Annona muricata* L.), empleando la microinjertación cíclica

Resumen

Las técnicas convencionales de multiplicación *in vitro*, en las cuales los propágulos son cultivados en contacto directo con el medio de cultivo, sobre él o sumergidos en él, no han sido eficientes en la propagación del guanábano. El proceso revelado en la presente invención, que denominamos microinjertación cíclica *in vitro*, es diferente de los anteriores en los siguientes aspectos: el tejido para micropropagar, que consiste en un microexplante proveniente de un árbol adulto seleccionado o un clon de éste, y que contiene una yema preexistente, no entra en contacto directo con el medio de cultivo sino que se alimenta de él a través de un portainjerto sobre el cual ha sido microinjertado. El portainjerto puede provenir de una semilla germinada *in vitro* de la misma especie del microexplante o de otra especie de anonáceas. El microinjerto se cultiva en condiciones relativamente simples y apropiadas para el desarrollo de la yema preexistente en el microexplante.

Se generan así, en promedio, 3.7 nuevas yemas por microinjerto cada 6 semanas, de las cuales pueden obtenerse también otros microinjertos. El uso de técnicas mejoradas de microinjertación permite que prendan, en promedio, 75% de los microinjertos. La operación puede repetirse cuantas veces sea necesario hasta obtener el número deseado de microinjertos, los cuales, después de un fase de endurecimiento y aclimatización —primero *in vitro* y luego en un invernadero—, producen árboles que se desarrollan normalmente una vez sembrados en el campo.

Este proceso es útil para la producción masiva *in vitro* de clones libres de enfermedades a partir de árboles adultos seleccionados de guanábano.

Reivindicaciones

Reivindicación No. 1

Un proceso de multiplicación clonal *in vitro* de plantas seleccionadas de guanábano que consta de los pasos siguientes:

- a) Establecer por lo menos un microinjerto *in vitro*, que crezca en condiciones de asepsia, a partir de (i) un microexplante proveniente de un árbol adulto seleccionado o un clon de éste que contenga yemas preexistentes, y (ii) una plántula obtenida de una semilla germinada *in vitro*;
- b) Cultivar el microinjerto obtenido en (a) en condiciones apropiadas para que se desarrolle la yema preexistente en el microexplante;
- c) Utilizar las yemas formadas por el microexplante para la producción de nuevos microinjertos sobre hipocotilos de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*;
- d) Repetir los pasos (b) y (c) cuantas veces sea necesario hasta obtener el número deseado de microinjertos.

Reivindicación No. 2

El proceso de la reivindicación 1, en el cual la microinjertación en los pasos (a) o (c), se realiza de la siguiente manera:

- a) En condiciones de asepsia, se prepara un microexplante que contenga una yema axilar o terminal, haciendo dos cortes oblicuos y convergentes (en forma de "V" o púa) en el tallo en que la yema se encuentra adherida, a la altura de la yema o inmediatamente debajo de ella;
- b) Cuando se trata de una yema axilar, se hace un corte transversal adicional en el tallo, 1 ó 2 mm por encima de la yema;
- c) Se prepara un portainjerto haciendo un corte transversal en el hipocotilo de una plántula obtenida de una semilla germinada *in vitro* de la misma especie que el microexplante o de otra especie de anonácea, aproximadamente 4 cm por encima de la corona (punto de unión de la raíz con el tallo) para eliminar el resto del hipocotilo, el nudo cotiledonar y el epicotilo;
- d) Se hace luego un segundo corte, esta vez longitudinal, de aproximadamente 3 mm de largo, que atraviese diametralmente el extremo superior del hipocotilo;
- e) Se introduce el microexplante en forma de púa en la ranura hecha en el portainjerto, de tal manera que los tejidos internos del microexplante y del portainjerto queden en contacto;
- f) Se introduce el extremo superior del portainjerto (con el microexplante ya insertado) en un utensilio cónico hueco y se presiona contra las paredes de éste de manera que los tejidos del microexplante y del portainjerto queden en contacto estrecho;
- g) Se cultiva el microinjerto *in vitro* durante varios días en condiciones apropiadas hasta lograr la unión de los tejidos del microexplante y del portainjerto.

Reivindicación No. 3

El proceso de la Reivindicación 2, en el cual las yemas usadas en la microinjertación han sido sometidas previamente a multiplicación *in vitro*.

Reivindicación No. 4

El proceso de la Reivindicación 2, en el cual las yemas usadas son aisladas del árbol seleccionado y microinjertadas directamente, después de haber sido desinfectadas superficialmente.

Reivindicación No. 5

El proceso de la Reivindicación 1, en el cual el microinjerto usado como fuente inicial de yemas, ha sido previamente certificado por medio de técnicas microbiológicas, bioquímicas o moleculares como libre de las enfermedades conocidas del guanábano.

Reivindicación No. 6

El proceso de la Reivindicación 5, que se emplea para el establecimiento de colecciones de clones seleccionados de guanábano *in vitro*, libres de las enfermedades conocidas de ese cultivo.

Reivindicación No. 7

El proceso de la Reivindicación 5, que se emplea para la multiplicación *in vitro* de plantas de guanábano libres de las enfermedades conocidas de ese cultivo.

Campo técnico de la invención

La presente invención está relacionada con el uso de los procesos y técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la multiplicación clonal masiva de plantas.

El cultivo *in vitro* consiste en el mantenimiento de tejidos aislados de plantas en soluciones nutritivas y en condiciones de total asepsia. Usando reguladores de crecimiento, principalmente del tipo de las citoquininas, como componentes de la solución nutritiva (medio de cultivo), es posible cultivar yemas de una planta adulta (de las cuales hay una en cada sitio de inserción de una hoja), inducir su brotación y multiplicarlas *in vitro* de manera ilimitada. Las yemas propagadas después de un proceso de elongación y enraizamiento pueden dar origen a un clon, es decir, a una planta genéticamente idéntica a aquella de la cual se extrajo la yema inicial. Las técnicas y medios de cultivo aquí revelados son útiles para la producción masiva *in vitro* de clones libres de enfermedades a partir de árboles adultos seleccionados de guanábano.

Antecedentes de la Invención

Guanábano y otras anonáceas: origen e importancia comercial

El guanábano (*Annona muricata* L.) es un árbol frutal perteneciente a la familia de las anonáceas (Annonaceae) conocido también por los siguientes nombres: "catuche" o "zapote agrio" (en español); "graviola" o "coração-de-rainha" (en portugués); "soursop" (en inglés); "corossol", "cachiman epineux" o "corossel" (en francés), "zuurzak" (en holandés). Se cultiva en muchas regiones de la zona intertropical, desde el sur de Florida (EE.UU.) hasta el sur de Brasil. Fue una de las primeras especies llevadas de América a otras regiones tropicales del mundo y por ello está bastante dispersa [1, 2, 3].

El fruto del guanábano, que puede pesar de 2 a 7 kg, contiene una pulpa de color blanco que es utilizada en la preparación de jugos, postres, yogures y helados [1, 2]. En Colombia y en otros países hay una creciente demanda por la fruta fresca y procesada, que no se suple con la producción local [1, 2, 5, 6]. En los mercados internacionales, la guanábana es poco comercializada pero podría ser, por su calidad y sabor, un producto de amplia aceptación en forma de jugo o pulpa. El fruto fresco se prestaría mejor para la exportación si se sigue la tendencia de ofrecer frutos de tamaño pequeño, tal como ha ocurrido con otras frutas tropicales como la piña y la papaya.

A la familia de las anonáceas pertenecen otras especies que producen frutos comestibles, como la chirimoya (*A. cherimolla* Mill.), el anón (*A. squamosa* L.), la guanábana del Chocó o cimarrona (*A. montana* Macfady), el anón amazónico o biribá (*Rollinia* spp.), la cabeza de negro o anón morado (*A. cinerea* Dunal), el anón pelón, mamón o corazón de buey (*A. reticulata* L.), el anón liso (*A. glabra* L.), el manirote o turangua (*A. purpurea* Mac & Sessé ex Dunal), todas ellas de origen americano [2, 3, 10]. A pesar de la calidad y el sabor de sus frutos, estas especies tienen importancia económica solamente a nivel local o regional, a excepción de la chirimoya, que se exporta a los mercados internacionales [1, 3, 6, 10].

Además de su importancia como producto alimenticio, la guanábana es rica en compuestos bioquímicos de potente actividad biológica, conocidos como acetogeninas, las cuales, desde su descubrimiento en 1982, se han convertido en uno de los grupos de sustancias naturales bioactivas de mayor crecimiento. Se cree que son los más potentes inhibidores del complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias, y de la enzima NADH oxidasa de la membrana plasmática, que es característica de las células cancerígenas. Algunas acetogeninas tienen la capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) de las células cancerígenas, probablemente a consecuencia de la supresión de la disponibilidad de ATP. Las acetogeninas de la guanábana y de otras anonáceas tienen también un gran potencial como biopesticidas. Extractos crudos de acetogeninas de la semilla de la guanábana podrían emplearse como pesticidas económicos, efectivos y no contaminantes del medio ambiente [7].

Importancia y riesgos de la propagación vegetativa

El largo período de tiempo que requeriría el trabajo de hacer cruzamientos y retrocruzamientos, y de evaluar progenies de híbridos ha llevado a los mejoradores a basar la obtención de variedades en la evaluación de la variabilidad existente y en la selección de árboles que tengan las características deseadas [2, 8]. Aunque la flor del guanábano es hermafrodita, el desarrollo asincrónico de los órganos masculino y femenino de ésta favorece la polinización cruzada por medio de insectos [1, 2]. Debido a esto árboles de guanábana en su estado natural son en realidad híbridos complejos. Por esta razón, la reproducción del guanábano por semilla ocasiona la pérdida de las características deseadas de los árboles seleccionados. Una vez que se identifica un material superior, éste se multiplica por vía vegetativa para evitar que las características deseadas segreguen y se pierdan en la progenie [34].

La costumbre, aún muy difundida, de los agricultores colombianos de establecer un cultivo de guanábano con material de siembra propagado por semilla puede considerarse la principal causa del promedio bajo (5 t/ha.año) de producción de esta especie frutal. Es posible lograr una producción de 30 t/ha.año, por lo menos, si se establecen los cultivos con clones obtenidos de material seleccionado [1]. Asimismo, la multiplicación de plantas de guanábano por semilla ha impedido el desarrollo de variedades caracterizadas.

La falta de material de siembra de buena calidad genética y fitosanitaria es uno de los principales problemas del establecimiento de cultivos tecnificados de guanábano en el trópico. Por ejemplo, en Colombia, donde existe una gran variabilidad nativa de guanábana [1, 10], sólo se comercializan una o dos variedades injertas caracterizadas [8].

La técnica más utilizada para la propagación vegetativa de esta anonácea es el injerto: varios tipos de injertos han tenido un éxito relativo en el guanábano [1]. Si bien el material vegetal producido por injertación es el apropiado para el establecimiento de cultivos, [1, 34], la distribución de material de siembra, nacional o importado, que se multiplica de esta manera tiene el riesgo de difundir plagas y enfermedades [4, 11, 12]. Las barreras que impone la cuarentena al movimiento de material vegetal vivo en las fronteras son importantes para impedir la difusión de organismos patógenos, pero dificultan el intercambio internacional de variedades seleccionadas y, por ende, el establecimiento de cultivos comerciales tecnificados.

Propagación in vitro para la producción de material de siembra y el intercambio internacional de germoplasma sano

Sería muy útil disponer de técnicas de multiplicación *in vitro* o de micropropagación para el guanábano, porque ellas impulsarían la investigación, el mejoramiento, el intercambio internacional de variedades, y la producción de material de siembra de calidad fitosanitaria y genética; fomentarían además el establecimiento de cultivos tecnificados. Las siguientes razones explican más el efecto de las técnicas dichas:

- Permitirían acelerar el desarrollo de nuevas variedades facilitando la propagación vegetativa de árboles seleccionados y su evaluación agronómica en diferentes localidades.
- Permitirían rescatar genotipos o especies en vías de extinción.
- Permitirían obtener material sano, libre de enfermedades, a partir de tejidos de árboles enfermos.
- Facilitarían el intercambio, la importación y la exportación de variedades y clones.
- Permitirían la multiplicación rápida de clones seleccionados.
- Dado el poco volumen que ocupan los cultivos *in vitro*, facilitarían el transporte y el envío de material de siembra [4, 11, 12]

El cultivo *in vitro* consiste en mantener tejidos aislados de una planta en soluciones nutritivas y en condiciones de asepsia total. Con ayuda de los reguladores del crecimiento, que son compuestos idénticos o análogos a las hormonas naturales de las plantas, es posible controlar los procesos de desarrollo de esos tejidos. Entre los reguladores más importantes en el cultivo de tejidos se cuentan las citoquininas, las auxinas y el ácido giberélico. La técnica más aplicada de propagación *in vitro* consiste en inducir el desarrollo de yemas y tallos a partir yemas ya

existentes en un tejido organizado, como son las yemas terminales y los nudos (yemas axilares en latencia). Para inducir el desarrollo y la formación de nuevas yemas en estos tejidos, se utilizan más que todo reguladores del crecimiento del tipo de las citoquininas, solos o combinados con menores concentraciones de auxinas.

Las yemas formadas pueden separarse y cultivarse nuevamente *in vitro* para que vuelvan a producir otras yemas; de esta manera se inicia un proceso de propagación de yemas ilimitado. Cada yema formada puede ser inducida a que se alargue (se 'elongue') y desarrolle un tallo, al cual se le induce, en medios de cultivo que contengan reguladores del crecimiento del tipo de las auxinas (o sin ellos) la formación de raíces, obteniéndose así una planta. La planta obtenida es un clon genéticamente idéntico a la planta de donde inicialmente se tomó el tejido [4].

Las plantas producidas *in vitro* tienen la ventaja de que pueden certificarse como libres de enfermedades y patógenos y, por tal razón, como aptas para el intercambio internacional [12]. Las técnicas de propagación vegetativa de plantas *in vitro* ya fueron desarrolladas para un considerable número de especies, entre las que se encuentran algunos frutales leñosos, y son explotadas comercialmente por laboratorios especializados en todo el mundo, los cuales ofrecen, a nivel internacional, el servicio de propagación masiva de una determinada especie vegetal [9, 13].

Varios obstáculos han impedido el desarrollo de metodologías eficientes de propagación *in vitro* del guanábano y de las anonáceas, orientadas a la producción masiva de material de siembra. Los principales son:

- dificultades en la desinfección de los explantes provenientes de árboles adultos;
- imposibilidad de lograr que broten *in vitro* las yemas aisladas de árboles adultos;
- oxidación de los tejidos *in vitro*;
- dificultades para lograr la elongación de las yemas inducidas *in vitro*;
- pérdida de las hojas de las plántulas cultivadas *in vitro*;
- enraizamiento de las yemas;
- aclimatización de las plántulas a condiciones *ex vitro* [14, 15, 16, 17].

Usando técnicas similares a las expuestas anteriormente, se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* de anonáceas [17, 35]. Ahora bien, estos protocolos no ofrecen una solución práctica a los problemas de la multiplicación clonal masiva *in vitro* de árboles adultos seleccionados, ya que han sido desarrollados empleando tejidos de plantas provenientes de semilla, pero no de clones seleccionados [17, 28]. Además la baja eficiencia de las técnicas desarrolladas y lo dispendiosa que resulta su aplicación hacen que su utilización comercial no sea práctica [17] (Tabla 1). Se desconoce la existencia de laboratorios en el mundo que puedan ofrecer material de siembra de anonáceas proveniente de la multiplicación *in vitro*.

En las especies leñosas en que las técnicas de cultivo *in vitro* de meristemas o de ápices caulinares aislados no han sido exitosas, la técnica de microinjertación ha sido de gran ayuda para la obtención de plantas completas. Esta técnica fue desarrollada por Murashige [18] y perfeccionada por Navarro et al. [19]; consiste en la unión de pequeñas yemas o ápices con patrones o portainjertos obtenidos, por lo regular, de semillas germinadas *in vitro*. Las yemas microinjertadas pueden originarse en árboles cultivados en el campo o en plantas cultivadas *in vitro*, y su tamaño puede estar entre los 0.1 y los 3 mm. La aplicación más importante de la microinjertación ha sido la obtención de plantas libres de virus empleando yemas de árboles infectados, en los cítricos [4, 18, 19] y en otros frutales leñosos [20]. Se ha aplicado también para acelerar el crecimiento de plántulas de kiwi provenientes de callos regenerados de protoplastos *in vitro* [21], para recuperar del estado juvenil tejidos provenientes de árboles adultos [22, 23], y para facilitar el estudio de la compatibilidad entre yemas y patrones de variedades diferentes [20]. La técnica se ha propuesto también para minimizar el riesgo de introducir organismos patógenos en el momento de importar material vegetal [11].

En la micropropagación, la microinjertación ha sido útil, aunque sólo indirectamente por dos razones importantes: los procedimientos son generalmente muy dispendiosos y el porcentaje de éxito ha sido en general bajo [4]. Por esta razón, las plantas obtenidas mediante la

microinjertación *in vitro* no se usan directamente como material de siembra sino como plantas madre de donde se obtienen yemas para procesos tradicionales de propagación [11].

En general, la microinjertación en anonáceas no ha sido reportada hasta el momento [15].

La invención que aquí se patenta presenta un proceso de micropropagación *in vitro* diferente de los que fueron desarrollados anteriormente en anonáceas, que resulta útil en la producción de material de siembra de guanábano. Este material se obtiene con una técnica de microinjertación modificada, que se combina con el uso ilimitado de microinjertos mantenidos *in vitro* como fuente de yemas para la producción de más microinjertos (microinjertación cíclica).

Objetivos y descripción detallada de la invención

Los principales objetivos de la presente invención son: lograr la multiplicación *in vitro* ilimitada de yemas de guanábano aisladas de plantas adultas o de clones de éstas, y desarrollar una metodología eficiente para la recuperación de plantas de esa especie a partir de las yemas multiplicadas. Fue necesario, para lograrlos, superar varios obstáculos que habían impedido aplicar eficientemente las tecnologías de multiplicación *in vitro* a esta especie (Tablas 1 y 2).

Los autores desarrollaron, por tanto, una novedosa metodología de microinjertación cíclica de yemas multiplicadas *in vitro*. Esta metodología es una alternativa a los procesos convencionales de micropropagación que, en las especies de anonáceas, no han sido eficientes.

1. Lugar de realización de los experimentos

Los experimentos que condujeron a la presente invención se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado en el municipio de Palmira (1000 msnm), Valle del Cauca, Colombia.

2. Material vegetal

Se utilizaron dos clones como fuente de yemas (plantas madre) para la estandarización del proceso, referidos en la presente invención como Clones I y II. Injertos convencionales del Clon I [8] fueron donados gentilmente por el vivero Profrutales Ltda. (Villagorgona, Valle del Cauca, Colombia). El Clon II fué seleccionado de un cultivo comercial de más de 6 años de edad localizado en Yaguará (800 msnm), en el departamento del Huila, Colombia. De este clon se hicieron injertos convencionales sobre patrones cultivados en bolsas [1]. Las plantas madre fueron mantenidas en un invernadero del CIAT.

3. Medios y condiciones de cultivo

Como recipientes de cultivo se usaron tubos de ensayo de vidrio de 25 x 150 mm con tapa plástica de polipropileno. Los medios de cultivo utilizados durante todo el procedimiento se describen en la Tabla 3 (Medios I, II, III y IV). Estos medios fueron esterilizados en autoclave (121 °C y 15 lb/plg²) durante 20 min y el material seco (vidriería y utensilios) durante 1 hora. En cada tubo de ensayo se vertieron, aproximadamente, 15 ml de medio de cultivo.

En las diferentes etapas del procedimiento se utilizaron las siguientes condiciones de cultivo:

- Condiciones de fotoperíodo: 29 ± 2 °C, 12 horas de fotoperíodo, 2000 lux (aprox., 27 micromol/m²/s, con lámparas de luz día Philips F40 D/XPT 40WATT).
- Condiciones de oscuridad: 29 ± 2 °C, en completa oscuridad.

4. Mantenimiento de las plantas madre

Una vez se tuvieron las plantas madre en el invernadero se realizó una poda severa para inducir la formación de nuevas yemas y se tuvo el cuidado de regarlas directamente en el suelo. Por lo menos 15 días antes de tomar los primeros explantes de ellas, se inició la aspersión foliar de las plantas con la Solución de Pretratamiento (Tabla 3), con un día de por medio; el propósito fué doble: facilitar la descontaminación de las microestacas que se cultivaron posteriormente en condiciones *in vitro* y aumentar la frecuencia de brotación de yemas.

5. *Corte, preparación y desinfección de las microestacas*

Con tijeras de jardinería se cortaron varias ramas jóvenes que tenían de dos a tres nudos (microestacas) y presentaban poca lignificación. Luego se cortaron las hojas de cada microestaca y se taponaron en éstas con esmalte de uñas las heridas causadas, para evitar que la solución de esterilizado penetrara los tejidos y los deteriorara durante la desinfección. Una vez seco el esmalte, las microestacas se introdujeron en un frasco de vidrio estéril con tapa, donde se realizó su desinfección superficial. Este proceso y los que le siguen se llevaron a cabo aplicando técnicas de trabajo aséptico en cámara de flujo laminar. La desinfección constaba de tres pasos:

- Lavado con agitación manual durante 1 minuto, con etanol al 70%.
- Lavado durante 12 minutos en la solución de desinfección (Tabla 3); de los 12 minutos, 6 se realizaron al vacío (250 mm de Hg) con la ayuda de una campana conectada a una bomba de vacío.
- Lavados consecutivos (cuatro) con agua deionizada estéril.

6. *Introducción de las microestacas a condiciones in vitro*

Después de la desinfección de las microestacas, se cortaron sus extremos sellados y se sembraron en el Medio I introduciéndolas cerca de 1 cm en el medio de cultivo; se conservó la polaridad que tenían las estacas en la planta, es decir, la parte proximal al tallo quedó en contacto con el medio de cultivo. Las microestacas se cultivaron en condiciones de fotoperíodo hasta que brotaron las yemas presentes en cada nudo, entre los 10 y 15 días de cultivo.

7. *Desarrollo de yemas y elongación*

Las microestacas cuyas yemas brotaron se transfirieron luego al medio de elongación de brotes axilares (Medio II, ver Tabla 3) y se incubaron en condiciones de fotoperíodo hasta que el brote elongado hubo desarrollado por lo menos cuatro (4) nudos. Cada nudo formado por el brote axilar era la fuente de una yema que podía ser microinjertada *in vitro* sobre un portainjerto (patrón), para obtener de esta manera un microinjerto.

8. *Germinación de semillas y preparación del patrón*

Paralelamente al proceso de obtención de yemas se llevó a cabo el proceso de producción de patrones para la microinjertación. Los patrones son plántulas de 10 a 20 días de nacidas a las cuales se les ha eliminado el epicotilo y parte del hipocotilo, haciendo un corte por debajo del nudo cotiledonar para dejar únicamente una parte del hipocotilo con la raíz. Para obtener las plántulas se hicieron germinar semillas *in vitro* en condiciones asépticas. El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Primero se desinfectaron y almacenaron las semillas en condiciones estériles. La desinfección de la semilla inmediatamente después de extraerla del fruto disminuye el riesgo de contaminación durante su germinación *in vitro*. En una cámara de flujo, y con la mayor asepsia posible, se extrajeron las semillas del fruto maduro y se introdujeron en un frasco estéril con agua deionizada estéril. Después de dos o tres lavados con agua deionizada estéril en agitación, se procedió a desinfectar la semilla tal como se hizo con las microestacas (ver numeral 5). Se escurrió el exceso de agua de la semillas desinfectadas y se almacenaron éstas en un frasco de vidrio de boca ancha previamente esterilizado, el cual se tapó con una cubierta doble de papel filtro estéril Whatman # 1 que permite el secado de la semilla y evita que entren contaminantes al frasco.
- Después de 15 días de secado en condiciones de fotoperíodo, la semilla se escarificó con la ayuda de un alicate y unas pinzas; se retiró la testa y se colocó el embrión con su tejido de reserva en la superficie del medio de germinación de semillas (Medio III, ver Tabla 3). El cultivo se realizó en Condiciones de Oscuridad y se prolongó hasta que el hipocotilo de la plántula nacida alcanzara una altura de 5 cm, por lo menos.
- El patrón para la microinjertación se preparó mediante un corte transversal en el hipocotilo de la plántula desarrollada *in vitro*, por lo menos 4 cm por encima de la corona (punto de unión de la raíz con el tallo); así se eliminaron los cotiledones y el epicotilo. Siguió a éste un corte

longitudinal de aproximadamente 3 mm desde el extremo superior del hipocotilo y atravesándolo diametralmente. En este sitio se hace la microinjertación.

9. *Proceso de microinjertación y tratamiento con antifenolizantes*

De los brotes elongados de las microestacas (ver numeral 7) se obtuvieron los explantes para la microinjertación. Estos consistían en yemas terminales o en un nudo con una yema axilar. Cada nudo del brote se preparó para la microinjertación haciendo, en el tallo, un corte transversal a 1 mm por encima de la yema y dos cortes oblicuos debajo de la misma, de manera que se obtuviera una estructura en forma de cuña o púa (microexplante) de 2 a 3 mm de longitud. Las yemas terminales del brote (el ápice más un nudo) se prepararon haciendo sólo los cortes oblicuos por debajo de ellas.

El microexplante se introdujo en el corte longitudinal de 3 mm, aproximadamente, hecho en el extremo superior del hipocotilo del patrón, obtenido como se indicó en la sección anterior (*Germinación de...*). Los cortes se hicieron en el patrón inmediatamente antes de la microinjertación para evitar que cicatrizaran. Para controlar la oxidación, los cortes del microexplante y del patrón se hicieron sobre papel filtro embebido con una solución acuosa estéril de PVP (polivinilpirrolidona, solución antioxidante, ver Tabla 3).

En el proceso de la presente invención, la unión de los tejidos del microexplante y del patrón depende de dos factores: la calidad de los cortes hechos en los tejidos (deben hacerse con una cuchilla 11 de bisturí bien afilada) y el contacto estrecho entre los tejidos. Para mantener unidos los tejidos, la parte superior del microinjerto se introdujo en una punta cónica amarilla de micropipeta (200 µl de capacidad; por ejemplo, de EppendorfTM) hasta que las paredes de ésta ejercieran una leve presión sobre la zona de microinjertación. El microinjerto (con la punta cónica sobre él) se cultivó durante una semana en el Medio III, en condiciones de oscuridad.

10. *Cultivo posterior del microinjerto*

Después de una semana, al microinjerto se le retiró la punta cónica, se introdujo en el Medio IV (ver Tabla 3) y se cubrió con una tapa de polipropileno; ésta venía con un agujero de 8 mm de diámetro por el que se hizo pasar un cilindro de espuma de 18 mm de diámetro por 20 mm de largo. Esta espuma permite el intercambio de gases del tubo con el exterior y conserva, a la vez, las condiciones de esterilidad del conjunto. El intercambio gaseoso es importante para evitar la caída de las hojas de la plántula que se desarrolla *in vitro*. El microinjerto se cultivó en condiciones de fotoperiodo y se mantuvo así hasta que los brotes elongados desarrollaron, por lo menos, 4 nuevos nudos y 2 ó 3 hojas, 4 a 6 semanas después.

11. *Microinjertación cíclica: microinjertos como fuente inagotable de yemas*

La utilización de las yemas producidas por microinjertos mantenidos *in vitro* para la producción de nuevos microinjertos (microinjertación cíclica), permitió prescindir de los pasos correspondientes a los numerales 4 a 7, antes descritos, e iniciar un proceso de microinjertación masiva en el cual el número de plántulas producidas creció exponencialmente. Este proceso consta de los siguientes pasos:

- después de 6 a 8 semanas de cultivo en condiciones de fotoperiodo, las yemas nuevas producidas por un microinjerto madre (microinjerto fuente de yemas) fueron retiradas de éste (cosechadas), teniendo cuidado de dejar siempre una, la más cercana al patrón, para que el microinjerto pudiera continuar con su desarrollo y ser cosechado nuevamente semanas después;
- cada uno de los nudos y yemas cosechados fueron microinjertados nuevamente como se indica en el numeral 9.

Los microinjertos madre cosechados pudieron crecer vigorosamente y fueron utilizados como fuente de yemas, en condiciones *in vitro*, por lo menos durante quince meses, subcultivándolos una vez cada 4 a 8 semanas en Medio IV fresco, en tubos con tapa de espuma.

12. Siembra de microinjertos en condiciones *ex vitro*

Después de 4 semanas de cultivo, aproximadamente, y con cuatro hojas ya desarrolladas, los microinjertos pudieron ser transferidos a suelo estéril, en condiciones controladas de invernadero. Durante los primeros 5 días se cultivaron en condiciones de semisombra y posteriormente con exposición solar directa, a una temperatura que oscilaba entre los 18 y los 30 °C. Los microinjertos recibieron entre 100 y 200 ml de agua por día; cuando desarrollaron de 10 a 12 hojas coriáceas de color verde y lustrosas, unos 6 meses después de iniciado su cultivo en el invernadero, los microinjertos se sembraron en el campo en huecos de 40 cm de ancho x 40 cm de largo x 60 cm de profundidad, en suelo franco mezclado con gallinaza (10 kg por hueco).

Ejemplos que ilustran el proceso de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran el proceso de la presente invención y sus aplicaciones, aunque no deben ser tomados como los únicos alcances de la invención:

Ejemplo 1. Método modificado de microinjertación para la recuperación de plantas a partir de yemas multiplicadas *in vitro*

Una modificación importante hecha a los métodos anteriormente publicados de microinjertación [4, 19, 20] y que es clave en la presente invención, fue la colocación de puntas cónicas (por ejemplo, las puntas amarillas de micropipeta de 200 µl de capacidad de EppendorfTM) sobre la unión injerto-portainjerto para garantizar el contacto estrecho entre los tejidos de la yema y del patrón. Este contacto directo, especialmente en los primeros días después de la microinjertación, es importante para lograr que se unan los dos tejidos y que continúen en desarrollo coordinado como un solo individuo. En los métodos anteriormente publicados, el contacto era garantizado únicamente por la presión propia del tejido del patrón (en los injertos de púa) o por la fuerza de gravedad [18, 19, 20, 23].

Además de ejercer presión sobre los tejidos, la punta cónica cumple también la función de mantener un ambiente húmedo en el punto de microinjertación evitando así la desecación del microexplant. La desecación de las yemas microinjertadas ha sido considerada una de las principales causas de la reducción de la eficiencia en la microinjertación [4, 23]. Se han diseñado métodos complicados con puentes de agar para evitar la desecación de las yemas microinjertadas en trabajos anteriores al nuestro [23], que han hecho más dispendiosa la técnica de microinjertación. El uso de la punta cónica, permitió incrementar el porcentaje de éxito de un 5 % sin punta hasta un 78 % con punta (ver Ejemplo 2).

Ejemplo 2. Propagación *in vitro* del Clon I por medio de la microinjertación cónica, para producir material de siembra.

El proceso de multiplicación *in vitro*, objeto de la presente invención, se desarrolló inicialmente con el Clon I [8]. Injertos tradicionales de este clon (plantas madre) de aproximadamente 3 meses fueron llevados a condiciones de invernadero, se les realizó una poda severa y se tuvo el cuidado de regarlos directamente en el suelo durante 6 semanas. Estos injertos fueron asperjados foliarmente con Solución de Pretratamiento (ver Tabla 3) cada día de por medio y por lo menos 15 días antes de extraer las microestacas con que se iniciaban los cultivos *in vitro*.

En nuestros experimentos el cultivo de microestacas enteras obtenidas de plantas madre en el invernadero (y no de las yemas aisladas de éstas) sumergidas parcialmente en el medio de cultivo fue inicialmente la única manera posible de cultivar yemas *in vitro* de guanábana que no se oxidaran y de producir *in vitro* tallos elongados de éstas.

De las plantas madre pretratadas se cortaban microestacas con dos o tres nudos. Las microestacas se desinfectaban superficialmente y se cultivaban en el Medio I (ver Tabla 3) para inducir la brotación de las yemas axilares. Los explantes se sembraron empleando técnicas de asepsia en una cámara de flujo laminar y se cultivaron en Condiciones de Fotoperiodo (ver numeral 3). La brotación ocurrió aproximadamente 15 días después de iniciado el cultivo con una frecuencia promedio del 69 % (microestacas que produjeron brotes axilares)..

Las microestacas con brotes desarrollados se transfirieron al Medio II (ver Tabla 3). El cultivo se continuó hasta que los brotes se elongaron y formaron nudos nuevos. La elongación se completó 20 días después del cambio de medio de cultivo con una frecuencia del 47%. En promedio, se desarrollaron 3.8 yemas microinjertables por nudo. Los brotes elongados fueron cosechados y los nudos y yemas terminales presentes en ellos utilizados para la microinjertación. Las microestacas fueron subcultivadas en el Medio I con el objetivo de inducir de nuevo la brotación de yemas, después de eliminarles por corte el tejido que estuvo en contacto con el medio de cultivo por estar completamente oxidado. Las yemas rebrotaron y se elongaron en las condiciones anteriormente descritas, y se utilizaron en una nueva microinjertación. Sin embargo, después del segundo subcultivo el agotamiento de las microestacas se hizo evidente: la brotación fue mínima y los brotes que se encontraban en contacto con el medio de cultivo comenzaron a oxidarse. Así pues, las microestacas representaron una fuente limitada de yemas.

El método generalmente usado de obtención de plantas completas a partir de yemas propagadas *in vitro*, y el único que ha sido aplicado en anonáceas [15], es el enraizamiento de las yemas en medios que contengan auxinas. Sin embargo, se sabe que este proceso puede ser dispendioso y poco efectivo [14, 17, 28]. Por tal razón, se usó la microinjertación de yemas, ayudada por puntas cónicas, sobre patrones provenientes de semillas germinadas *in vitro* (ver Ejemplo 1).

Al contrario de las yemas cultivadas directamente sobre el medio de cultivo (técnica convencionalmente usada en el cultivo de tejidos) las cuales se oxidan rápidamente, y en las que difícilmente se logra inducir la elongación, las yemas de guanábano microinjertadas se elongaron y desarrollaron rápidamente produciendo plántulas de vigoroso crecimiento que alcanzaron aproximadamente 3 cm de tamaño un mes después.

Cada microinjerto producido fue examinado con detenimiento para comprobar que la yema desarrollada se originara del microexplantado y no del patrón, ya que ocurre frecuentemente que yemas adventicias se forman en el extremo superior del patrón.

Los microinjertos cultivados en tubos de ensayo completamente sellados, tal como se acostumbra en el cultivo *in vitro*, perdieron sus hojas, y esto afectó su desarrollo. Este fenómeno ha sido observado también en anón [16]. Las tapas con tapones de espuma antes descritas permitieron solucionar de manera práctica este problema.

En general en especies herbáceas, una vez que un nudo *in vitro* empieza a producir yemas por brotación axilar, este nudo y los nuevos que se formen pueden utilizarse indefinidamente en la producción de un número ilimitado de nuevas yemas [24]. En el guanábano, en cambio, sólo fue posible la producción de yemas elongadas cultivando microestacas recién introducidas del invernadero a condiciones *in vitro*. La producción de yemas por estas microestacas resultó limitada (ver Ejemplo 1). Fue necesario, por tanto, introducir periódicamente microestacas a condiciones *in vitro* para poder producir nuevos microinjertos. Esta limitación haría que la metodología de multiplicación clonal por microinjertación fuera poco práctica para la propagación masiva. Dado el desarrollo vigoroso de los microinjertos durante el crecimiento *in vitro*, se decidió usar microinjertos producidos con anterioridad, y mantenidos en condiciones asépticas, como fuente de yemas para la producción de nuevos microinjertos, lo que denominamos microinjertación cíclica. De este modo bastaría con producir un solo microinjerto *in vitro* para iniciar un proceso de propagación de yemas.

Se partió de nueve microinjertos madre del Clon I mantenidos en el Medio IV en Condiciones de Fotoperíodo, a los que se le "cosecharon", entre tres y ocho nudos, teniendo la precaución de dejar en cada microinjerto madre una yema que pudiera rebrotar. Los nudos cosechados se microinjertaron en hipocótilos de plántulas obtenidas *in vitro* de semillas del Clon I. Se obtuvieron 36 microinjertos de 53 realizados (68 % de éxito) los cuales, después de 45 días de cultivo en Condiciones de Fotoperíodo, estaban listos para ser utilizados como fuente de yemas.

Después de ser cosechados los microinjertos madre se subcultivaron en el Medio IV fresco y se continuó con su cultivo.

En promedio, de cada microinjerto cultivado *in vitro* se pudieron cosechar cada 45 días 3.7 yemas microinjertables y un mismo microinjerto madre pudo ser cosechado hasta 12 veces, durante 18 meses.

Los porcentajes de 'prendimiento' de los microinjertos fueron incrementándose gradualmente a medida que avanzaban los ciclos de microinjertación, hasta alcanzar un 78% (ver Tabla 5); este mismo fenómeno se observó durante la microinjertación cíclica del Clon II (ver Ejemplo 5) y su posible explicación es la juvenilización de las yemas microinjertadas, causada por la repetida microinjertación, tal como ha sido reportado en otras especies [4, 23].

Después de 45 días en el Medio IV, los microinjertos ya habían alcanzado un desarrollo suficiente como para ser transferidos a condiciones de invernadero.

Si se tiene en cuenta la tasa de multiplicación de yemas microinjertables cada seis semanas (3.7), el porcentaje de prendimiento alcanzado en la microinjertación (75%), las pérdidas por contaminación (8.6%) y el hecho de que microinjertos utilizados como fuente de yemas pueden ser cosechados nuevamente seis semanas después, se puede calcular el siguiente índice de multiplicación de yemas microinjertables: $n \times 3.7 \times 0.75 \times 0.91 + n$, donde n es el número de microinjertos madre disponibles al inicio de cada ciclo de propagación. Aplicando este índice es posible calcular en 78847 el número de microinjertos que se pueden producir en 54 semanas partiendo de uno solo cultivado *in vitro*. Esta cantidad de plántulas serviría para establecer, aproximadamente, 386 hectáreas a una densidad de 204 plantas por hectárea.

Ejemplo 3. Comportamiento de los microinjertos en condiciones de invernadero y de campo.

Hay tres aspectos de singular importancia en la aplicación de un método de propagación *in vitro* a una especie frutal arbórea:

- La fidelidad al genotipo inicial, es decir, que las plantas propagadas sean genéticamente idénticas a la planta madre; se debe evitar, por tanto, que ocurran cambios genéticos durante el proceso de propagación de las yemas *in vitro* [4, 25].
- El desarrollo de la raíz de la plántula, es decir, que la raíz no se debe atrofiar durante el proceso; esta sería la causa de un volcamiento posterior de los árboles en el campo.
- La ausencia de características de juvenilidad, condición que puede retardar la floración durante varios años y afectar por ello la producción [4, 25].

El proceso de propagación empleado en la presente invención no incluye la inducción de yemas adventicias sino que depende netamente de la brotación axilar; este método es el más recomendado en la literatura para evitar que ocurran cambios genéticos [26]. Ninguna malformación atribuible a cambios genéticos se ha detectado en los microinjertos producidos hasta la fecha.

Pueden esperarse pequeñas diferencias en el crecimiento entre un microinjerto y otro, las cuales se deben a la influencia del patrón ya que éste no es de origen clonal y, por tanto, no es 100% homogéneo. Ni en la guanábana ni en otras especies de anonáceas se han identificado patrones que aporten características especiales al árbol y que, por lo tanto, justifiquen la propagación clonal de éstos.

Las plántulas producidas a través de la microinjertación cíclica, una vez desarrollaron de tres a cuatro hojas *in vitro* (aproximadamente 6 semanas después de la microinjertación) fueron transferidas a condiciones de invernadero. De los 537 microinjertos del Clon I producidos (Tabla 5) pudieron ser establecidos en el invernadero 483 (90%). Después de 3 meses de crecimiento, el sistema radicular de estas plantas mostró un desarrollo normal, con abundantes raíces secundarias en su primer tercio por debajo de la corona, lo que es característico del guanábano [1].

Se evaluó en 5 localidades diferentes, entre los 600 y 1200 msnm., el crecimiento de los microinjertos en condiciones de campo. De 165 microinjertos sembrados 163 continuaron su crecimiento (porcentaje de supervivencia del 99%). Después de 13 meses en el campo, 25 han florecido por primera vez; emitiendo, en promedio, 4.6 flores por planta. Este período equivale al tiempo transcurrido hasta la primera floración de los injertos producidos con la técnica tradicional [8], lo que indica que el desarrollo de las plantas obtenidas mediante microinjertación cíclica es normal.

Ejemplo 4. Microinjertación directa *in vitro* de yemas del Clon I aisladas de árboles adultos cultivados en el campo, sobre patrones obtenidos de semillas germinadas *in vitro*

En el Ejemplo 2 se demostró que es posible lograr la brotación de yemas en microestacas cultivadas *in vitro*, provenientes de clones adultos seleccionados, pretratados y mantenidos en condiciones de invernadero. Se demostró además que es posible iniciar el proceso de microinjertación cíclica con las yemas producidas por microinjertos cultivados *in vitro*.

El experimento de este ejemplo se realizó para investigar la posibilidad de microinjertar directamente, sobre patrones cultivados en tubos de ensayo, yemas aisladas de árboles adultos mantenidos en el campo; de esta manera se evitaría el uso de injertos tradicionales, mantenidos en invernadero, como plantas madre. Esto facilitaría el proceso de recolección de yemas de árboles seleccionados y reduciría el tiempo necesario para iniciar el proceso de propagación por microinjertación cíclica. Se escogió un árbol adulto del Clon I (de 6 años de edad, aproximadamente), en una plantación comercial de Guacarí, Valle del Cauca. Se marcaron con una cinta varias ramas jóvenes de las que se cortaron las yemas terminales y las hojas, dejando únicamente el pecíolo adherido a la rama. Diariamente, durante 7 días, se asperjaron las ramas marcadas con Solución de Pretratamiento (Tabla 3). Después se cortaron las ramas pretratadas, se llevaron al laboratorio y se desinfectaron (ver numeral 5). Se prepararon las yemas siguiendo la metodología explicada en el numeral 9 (con la única diferencia que las yemas microinjertadas fueron de mayor tamaño que las obtenidas *in vitro*) y se microinjertaron sobre hipocotilos obtenidos de semillas germinadas del Clon I.

De 56 microinjertos realizados, 38 se contaminaron, 15 murieron o no brotaron, y 3 fueron exitosos, los cuales se mantuvieron verdes y brotaron 15 días después de microinjertados. Con yemas producidas por estos microinjertos se inició un proceso de microinjertación cíclica similar al presentado en el Ejemplo 2, lo que demuestra que la metodología de microinjertación cíclica de la presente invención puede iniciarse directamente con yemas provenientes de árboles adultos seleccionados en el campo.

Ejemplo 5. Adaptación de la técnica de microinjertación cíclica a otros clones seleccionados de guanábano.

Este experimento se realizó para investigar la posibilidad de adaptar el proceso de microinjertación cíclica desarrollado con el Clon I a otros clones seleccionados de guanábano. El Clon II proviene de uno de los árboles más productivos (120 kg por año) de un cultivo comercial de 12 ha establecido a partir de semillas en 1991, en el departamento del Huila, Colombia. Se produjeron 5 injertos tradicionales por el método de "parche" [1], los cuales se transfirieron a un invernadero en el CIAT. El cuidado de las plantas, el pretratamiento, la elección y el corte de las estacas, su esterilización y el cultivo inicial fueron similares a los del Ejemplo 2.

A partir de 6 brotes axilares de microestacas, que produjeron 14 nudos microinjertables, se obtuvieron 7 microinjertos (50% de éxito) siguiendo la metodología de microinjertación descrita en el Ejemplo 1 y utilizando como patrón hipocotilos de plántulas obtenidas de semillas del Clon I. Estos 7 microinjertos se utilizaron para iniciar el proceso de microinjertación cíclica, 6 semanas después (Tabla 6). Como ocurrió con el Clon I, en el Clon II se incrementó el porcentaje de éxito de la microinjertación a medida que se avanzaba con los ciclos de cultivo. En conclusión, la metodología desarrollada en el Clon I pudo ser adaptada para la propagación *in vitro* de una selección de guanábano diferente (ver Tabla 6).

Novedades de la presente invención frente al estado del arte

Para que la micropropagación *in vitro* pueda aplicarse en la producción masiva de material de siembra de óptima calidad genética de guanábano, tienen que cumplirse tres requisitos importantes:

- La micropropagación debe lograrse a partir de tejido (yemas) aislado de árboles adultos o de clones de éstos, de los cuales se conozcan sus características agronómicas de interés. Por

consiguiente, las yemas deben provenir de árboles de 6 años de edad, por lo menos, ya que árboles de menor edad no están en una etapa de producción madura. [1].

- Se debe evitar la regeneración de plantas a partir de yemas que no sean netamente axilares con el fin de disminuir el riesgo de que ocurran mutaciones y cambios genéticos en las plantas propagadas [26].
- El costo de aplicar la nueva metodología de propagación debe ser competitivo con el de las técnicas de injertación tradicionales. Estos costos están directamente relacionados con la eficiencia de la propagación [27].

Solo el proceso que es objeto de la presente invención y ninguna de las metodologías de propagación *in vitro* desarrolladas anteriormente para las anonáceas [15, 17, 28, 35] llena estos tres requisitos. En la mayoría de los protocolos publicados anteriormente ha ocurrido lo siguiente:

- se ha utilizado como explante un tejido proveniente de plantas obtenidas de la germinación de semillas *in vitro* [28, 35] o de árboles jóvenes mantenidos en un invernadero [17];
- el proceso de propagación incluye la formación de yemas adventicias [29];
- se recurre a la elongación y al enraizamiento de las yemas propagadas, lo que requiere de varios pasos en diferentes medios de cultivo y sólo se logra con una eficiencia reducida haciendo así la técnica costosa [17].

Los métodos convencionales de propagación *in vitro* consisten en mantener los propágulos (yemas aisladas o tallos con yemas) en contacto directo con el medio de cultivo, o sea, sobre él o sumergidos en él [4]. En el proceso objeto de la presente invención, en cambio, el tejido que se desea propagar no se mantiene en contacto directo con el medio de cultivo porque se cultiva microinjertado en un patrón o portainjerto *in vitro*, el cual cumple la función de tejido alimentador.

De esta manera se corrigen los problemas de oxidación, elongación y enraizamiento que habían impedido la aplicación eficiente de los procesos de multiplicación *in vitro* en el guanábano y en las anonáceas en general (ver Tabla 1 y 2). En los microinjertos, el tejido que se desea micropropagar, por el hecho de no estar en contacto directo con el medio de cultivo, no se oxida. Por alguna razón que se desconoce, el portainjerto induce la rápida elongación y desarrollo de las yemas microinjertadas sobre él, algo que difícilmente se logra con las yemas cultivadas *in vitro* mediante los métodos convencionales. Finalmente, el patrón ya tiene un sistema radicular formado y no necesita ser sometido a procesos de enraizamiento.

La microinjertación *in vitro* ha sido una técnica ampliamente utilizada en especies frutales leñosas, sobre todo para producir plantas libres de virus a partir de yemas de árboles infectados. En este campo, principalmente en cítricos, ha sido de gran utilidad [4, 11, 20]. Ni en guanábano ni en otras anonáceas la microinjertación *in vitro* había sido reportada antes. Tampoco se ha reportado su uso directo en la propagación masiva *in vitro* de especies leñosas, en general; por lo menos, se desconoce la existencia de viveros especializados o de laboratorios que ofrezcan comercialmente microinjertos producidos *in vitro* como material de siembra.

La microinjertación *in vitro* no había encontrado anteriormente aplicación directa en la propagación comercial de especies leñosas a causa, posiblemente, del grado de dificultad que tiene la aplicación de las metodologías antes disponibles y de las eficiencias relativamente bajas logradas con éstas [4, 11, 20, 23].

Dos modificaciones que hace la presente invención a las metodologías de microinjertación publicadas convierten a ésta en una técnica útil en la propagación clonal masiva de guanábano y, posiblemente, de otras especies leñosas:

- el uso de puntas cónicas para forzar un contacto directo y estrecho entre los tejidos del microexplante y los del patrón, que permitió incrementar la eficiencia de la microinjertación;
- la introducción del concepto de microinjertación cíclica *in vitro* como herramienta de propagación vegetativa de yemas.

El uso de microinjertos previamente producidos y mantenidos *in vitro* como fuente de yemas para nuevas microinjertaciones, proceso que hemos denominado *microinjertación cíclica*, permite prescindir de las plantas madre mantenidas en un invernadero o en el campo, y reducir de

esta manera la pérdida de cultivos por contaminación. Permite además iniciar todo un proceso de propagación clonal, usando como punto de partida, un solo microinjerto que se logre producir.

La estabilidad genética de las plantas producidas *in vitro* es un aspecto importante que preocupa a los usuarios del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, ya que, en repetidas ocasiones, se ha reportado la obtención de altos porcentajes de plantas que difieren, morfológica- y genéticamente, de la planta original. Este resultado ha repercutido negativamente en la producción de los cultivos que se han establecido con ese tipo de plantas [25, 26, 27]. La metodología utilizada en la presente invención para inducir la multiplicación de las yemas, o sea, la emisión axilar ('brotación') de yemas preexistentes, evita la inducción de yemas adventicias; esa metodología es la más recomendada en la literatura especializada para evitar cambios genéticos en los tejidos [26]. Más aún, una vez lograda la producción del primer microinjerto, la microinjertación cíclica permite prescindir de los reguladores de crecimiento durante todo del proceso de propagación. La presencia de ciertos reguladores de crecimiento en los medios de cultivo ha sido relacionada con la ocurrencia de cambios genéticos en las plantas propagadas *in vitro* [25].

El cultivo de microinjertos *in vitro* requiere medios de cultivo simples y poca infraestructura. Los procesos de desinfección de los explantes usados en el momento de iniciar un cultivo *in vitro* eliminan del tejido organismos patógenos fungosos y bacterianos. Con técnicas adicionales, como la termoterapia o la aplicación de sustancias antivirales, es posible eliminar las enfermedades virales en árboles infectados [4]. En Colombia no se conoce ninguna enfermedad viral del guanábano pero podría aparecer como consecuencia de la intensificación del cultivo. El proceso de microinjertación cíclica permitiría establecer colecciones de clones elite que hayan sido indexadas previamente, con técnicas apropiadas [4], como libres de las enfermedades conocidas del cultivo, en condiciones de mínimo crecimiento. Los microinjertos estarían disponibles de manera inmediata para iniciar los procesos de propagación masiva que se requieran. Las plántulas producidas de esta manera ocupan un volumen reducido y están sometidas a muy pocos requerimientos de cuarentena [4, 12]; podrían, por tanto, comercializarse internacionalmente.

Además, a diferencia de las técnicas comunes de propagación de plantas *in vitro*, en las que se enraizan yemas multiplicadas *in vitro*, el proceso de microinjertación cíclica permite explotar plenamente la posibilidad de usar patrones de otras variedades de la misma especie o de otras especies de anonáceas. Seleccionar patrones que aporten robustez, resistencia a enfermedades provenientes del suelo y adaptabilidad a diferentes tipos de suelo es una práctica tradicional, de gran utilidad en el cultivo de árboles frutales [30].

La técnica de microinjertación cíclica revelada en la presente invención permite lograr la producción de mas de 78 847 microinjertos en un año, partiendo inicialmente de un solo microinjerto (ver Ejemplo 3).

En conclusión, son numerosas las ventajas del método de propagación *in vitro* de guanábano por microinjertación cíclica. Lo convierten, por tanto, en un proceso útil para producir material de siembra de óptima calidad fitosanitaria y genética.

Referencias

1. Escobar W.; L. Sánchez. Guanábano. En: Fruticultura Colombiana. A. Morales (ed.). Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 1992.
2. Villachica H. Frutas y hortalizas promisorias de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazónica (TCA), 1996. < <http://www.spt-tca.org/Public/44/hsaa.htm> >.
3. Morton J. Fruits of warm climates. Vol. 1. J. Morton (ed.). Miami FL, 1987.
< <http://www.hort.gurdus.edu/newscrop/morton/index.htm> >
4. George E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology. Second (revised edition). Edington, Wita: Exogenetica, 1993.
5. Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle (SAG) y Fundación para el Desarrollo Integral del Valle del Cauca (FDI). Marco de Referencia para la Propuesta de Activación del Sector Frutícola del Valle del Cauca. Cali, Colombia. 1998.
6. Corporación Colombia Internacional.. Guanábano. Información básica por producto. SIESA. Documento en preparación. (2000)
7. McLaughlin, J. L., L. Zeng, N.H. Oberlies, D. Alfonso, H.A. Johnson, B.A. Cummings. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent progress. Phytochemicals for pest control /. Washington, DC : American Chemical Society (1997): 117-133.
8. Ríos-Castaño D.; C.E. Reyes. Guanábano Elita. Agricultura Tropical 33 (3, 1996):97-101.
9. Litz R.E.; V.S. Jaiswal. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: Micropropagation technology and application. P.C Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991.
10. Pérez-Arbeláez E. Plantas útiles de Colombia. 3a. ed., Medellín: Editorial Victor Hugo, 1990.
11. Navarro L. Application of shoot-tip grafting to woody species. Acta Hort. 227 (1988):43-55.
12. Schilde-Rentschler L.; W.M. Roca. Tissue culture for the international exchange of potato and cassava germplasm. En: Biotechnology in agriculture and forestry. 3: Potato. Y.S.P. Bajaj (ed.). Heidelberg, Alemania: Springer -Verlag, 1987. p. 453-465.
13. Barnhill-Jones J.; C.J. Sluis. Marketing of micropropagated plants. En: Micropropagation. technology and application. P.C Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991.
14. Castaño-Hernández A. Evaluación organogénica *in vitro* de plantas juveniles de *Annona muricata* Linn. (guanábano). Tesis. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 1996.
15. Rassi S. G.; A.P. Kantharajah. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. Scientia Hort. 62 (1995):1-14.
16. Armstrong J.; E.E.P. Lemos; S.M.A. Zobayed; S.H.F.W. Justin; W. Armstrong. A humidity-induced convective throughflow ventilation system benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. Annals of Botany 79(40, 1997):31-40.
17. Lemos E. E. P.; J. Blake. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. J. of Horticultural Science. Ashford: Headley Brothers, 1996. p. 395-403.
18. Murashige T.; E.M. Bitter; E.M. Rangan; C.N. Nauer; C.N. Roistacher; P.B. Holliday. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. HortScience 7(1972):118-119.
19. Navarro L.; C.M. Roistacher; T. Murashige. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (5, 1975):471-479.
20. Jonard R.; J. Hugard; J.- J. Macheix; J. Martínez; L. Mosella-Chancel; J.L. Poessel; P. Villemur. *In vitro* micrografting and its application to fruit science. Scientia Hort. 20 (1983):147-159.
21. Ke S.; Q. Cai; R. M. Skirvin. Micrografting speeds growth and fruiting of protoplast-derived clones of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). J of Horticultural Science. Ashford: Headley Brothers, 1993. p. 837-840.
22. Tranvan H.; F. Bardat; M. Jacques; Y. Arnaud. Rejuvenation in *Sequoia sempervirens*: effects of *in vitro* micrografting. Ottawa, Canadá: National Research Council of Canada. Can. J. Bot (1991):1772-1779.
23. Pliego-Alvaro F.; T. Murashige. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. HortScience 22(6, 1987):1321-1324.
24. Molnár G.; Tétényi P.; Dobos E.; Bernáth J. Process for the sterile micropropagation of plant material. United States Patent 4,569,914. Washington DC, 1986.
25. Swartz H., J. Post-culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. En: Micropropagation. technology and application. P.C Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991.
26. Debergh P. y Read P. Micropropagation. En: Micropropagation. technology and application, P.C Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991.
27. Standaert Mettenaere de R.E.A. Economic considerations. En: Micropropagation. technology and application, P.C Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991.
28. Bejoy, M. y M. Hariharan. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 31(1992):245-247.
29. Lemos E.E.P. y D.A. Baker. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata*. Plant Growth Regulation 25(2, 1998):105-112.

30. Tamaro D. Tratado de fruticultura. Barcelona: Gustavo Gili, 1920.
31. Iglesias A. Propagación del guanábano (*Annona muricata* L.) por medio de injerto sobre diferentes patrones de anonáceas. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 1984.
32. Lloyd G. y B. McCown. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30 (1981):421-427.
33. Gamborg O.L.; R.A. Miller; K. Ojima. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. (50, 1968):151-158.
34. Christie C.B. y M. A. Nichols. Multiplying the elite: Vegetative propagation produces better plants and higher yields of food and ornamental crops. Agribusiness Worldwide, 1994. p. 16-26.
35. Encina C. L.; A. Barceló-Munoz; A. Herrero-Castaño; F. Pliego-Alfaro. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. bud explants. J. of Horticultural Sciences. Ashford: Headley Brothers, 1994. p. 1053-1059.

Tablas

Tabla 1. Resumen de la situación actual de los procesos de cultivo de tejidos para la propagación del guanábano.

Informe	Modo de obtención de yemas	Explante utilizado	Observaciones
Bejoy y Haribaran, 1992.	Regeneración adventicia por organogénesis	Hipocotilos de plántulas provenientes de semillas germinadas <i>in vitro</i> .	Sistema poco eficiente: Metodología desarrollada no permite la propagación clonal de árboles seleccionados.
Lemos y Bleck, 1996	Regeneración adventicia por organogénesis	Hipocotilos de plántulas provenientes de semillas germinadas <i>in vitro</i> ; Nudos de árboles de 4 años de edad obtenidos de semillas.	Muy costosa su implementación a escala masiva. Metodología desarrollada no permite la propagación clonal de árboles seleccionados.
Castiño Hernández, 1996	Regeneración adventicia por organogénesis	Hojas y nudos de plantas jóvenes de invernadero obtenidas de semillas.	Bajos niveles de enraizamiento. No se logró la micropropagación de los explantes.
Lemos y Baker, 1998	Regeneración adventicia por organogénesis	Entrenudos	Metodología desarrollada no permite la propagación clonal de árboles seleccionados.

Tabla 2. Obstáculos al desarrollo de metodologías de propagación clonal *in vitro* de guanábana y soluciones que aporta la presente invención.

Obstáculos	Soluciones aportadas
Microorganismos presentes en la superficie de los árboles seleccionados impiden la iniciación de los cultivos <i>in vitro</i> [4]	Los árboles o plantas madre son tratados previamente con antibióticos, antimicóticos y reguladores del crecimiento para reducir o eliminar los contaminantes superficiales e incrementar la emisión de yemas (brotación) en condiciones <i>in vitro</i> .
Las yemas provenientes de árboles adultos no brotan una vez transferidas a condiciones <i>in vitro</i> [*]	Las plantas madres son pretratadas con reguladores del crecimiento (BAP) que incrementan la 'brotación' de las yemas presentes en el tejido
Dificultades en la multiplicación <i>in vitro</i> de las yemas cultivadas[*]	Se desarrollaron medios y condiciones de cultivo que permiten la multiplicación de las yemas
Después de haber brotado, las yemas no se elongan[*]	Se desarrollaron medios y condiciones de cultivo que permiten la elongación de las yemas multiplicadas
Las plántulas o tallos de anonáceas pierden las hojas durante el cultivo <i>in vitro</i> [16]	Las tapas con tapones de espuma para los tubos de ensayo que contienen las plántulas permiten el intercambio gaseoso y solucionan el problema de las caldas de las hojas.
Oxidación de los tejidos e imposibilidad de enraizar o baja eficiencia en el enraizamiento de las yemas multiplicadas y elongadas[28, 14]	Se desarrolló una metodología de microinjertación para evitar la oxidación y la necesidad de enraizar los tallos elongados

[*] Observaciones de los autores

Tabla 3. Medios de cultivo y soluciones utilizados en el proceso de microinjertación cíclica.

Medios	Uso	Medio basal*	Agar	Regulador del crecimiento** o compuesto adicional
Medio I	Inducción de la emisión de las yemas axilares ('brotación')	WPM [32]	0.55%	BAP 1 mg/L
Medio II	Inducción de la elongación de las yemas axilares	WPM	0.55%	BAP 0.2 mg/L
Medio III	Germminación de semillas, microinjertación	B5 [33]	0.5%	Giberelina 0.5 mg/L Caseína hidrolizada 200 mg/L
Medio IV	Desarrollo de microinjertos <i>in vitro</i> , elongación de brotes axilares injertados	WPM con vitaminas del medio B5	0.55%	
Solución de pretratamiento	Pretratamiento de los árboles o plantas madre antes de tomar sus ramas y yemas para la propagación			Benlate™ 1g/L, tetraciclina 50mg/L, sulfato de estreptomina 100mg/L y benzilaminopurina (BAP) 5mg/L
Solución de desinfección	Desinfección de explantes y de semillas			Hipoclorito de sodio al 1% adicionado con 100µl/L de jabón líquido (SC Johnson Professional)
Solución antioxidante	Medio líquido para que disminuya la oxidación de los tejidos al cortarlos durante la microinjertación	WPM sin sacarosa		Polivinilpirolidona 1 g/L

* Todos los medios contienen 2% de sacarosa. El pH de 5.7 fué ajustado con KOH antes de ser esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 lb /pulg², durante 20 min. L = litro.

** Se preparó una solución madre de reguladores del crecimiento disolviéndolos a una concentración de 10 mg/ml en DMSO (dimetilsulfóxido), y se conservó la solución en el congelador a -20 °C.

23

Tabla 4. Composición de los medios WPM [32] y B5 [33] utilizados en el proceso.

Componente	WPM Concentración (mg/l)	B5 Concentración (mg/l)
CaCl ₂	72.50	113.23
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556.00	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.025
FeNaEDTA	36.70	36.70
H ₃ BO ₃	6.20	3.00
KI	-	0.75
KH ₂ PO ₄	170.00	-
KNO ₃	-	2500.00
K ₂ SO ₄	990.00	-
MgSO ₄	180.70	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	250.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	10.00
NaH ₂ PO ₄	-	130.44
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
NH ₄ NO ₃	400.00	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134.00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	2.00
Glycine	2.00	-
Myo-inositol	100.00	100.00
Acido nicotínico	0.50	1.00
Pyridoxina HCl	0.50	1.00
Thiamine HCl	1.00	10.00

Tabla 5. Eficiencia de la microinjertación cíclica de yemas del Clon I producidas por microinjertos mantenidos *in vitro*, sobre patrones del mismo clon.

Ciclo	Microinjertos madre disponibles	Microinjertos realizados	Microinjertos obtenidos	Porcentaje de éxito
1	9	53	36	68
2	45 (9+36)	129	90	70
3	135 (45+90)	527	411	78
	Total	709	537	75

Tabla 6. Eficiencia de la microinjertación cíclica de yemas del Clon II producidas por microinjertos mantenidos *in vitro*, sobre patrones del Clon I.

Ciclo	Microinjertos madre disponibles	Microinjertos realizados	Microinjertos obtenidos	Porcentaje de éxito
1		14	7	50
2	7	31	18	58
3	25 (7+18)	77	47	62
4	72 (47+25)	216	155	72
	Total	338	227	67.1

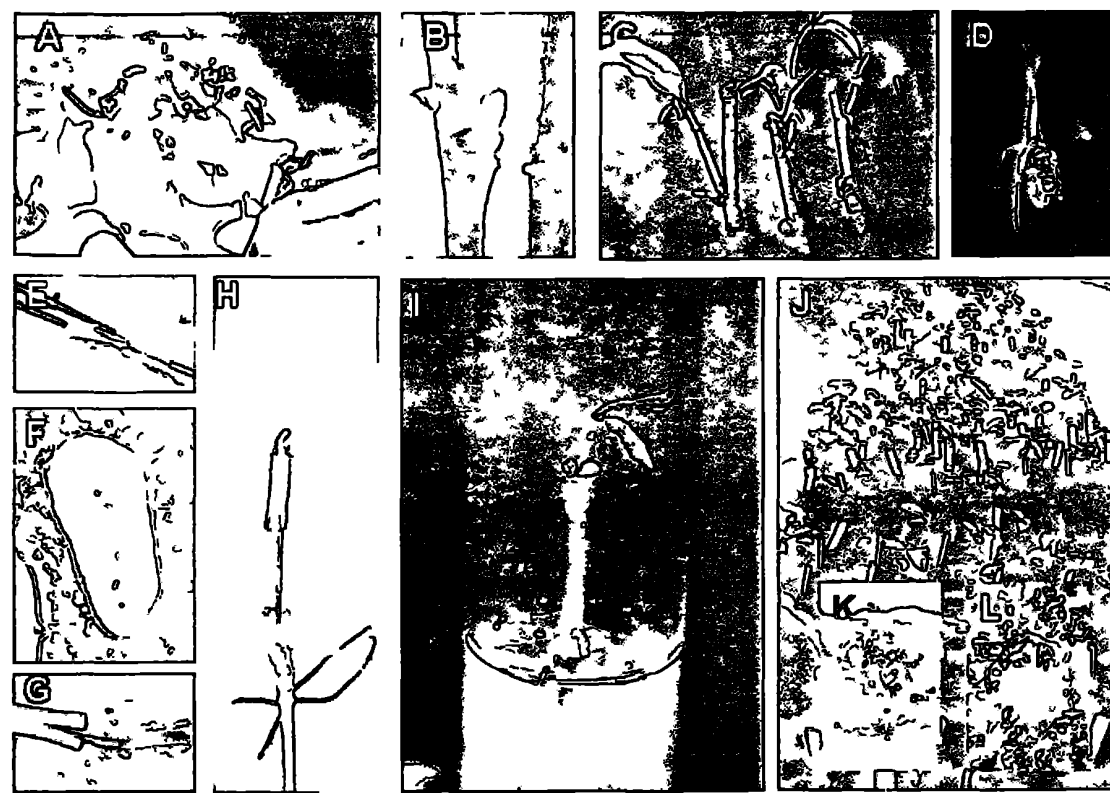


Figura 1 Proceso de propagación clonal *in vitro* de guanábano por microinjertación cíclica.

- A) Corte de ramas jóvenes de clones de árboles seleccionados, para la obtención de microestacas con yemas axilares.
- B) Brotación *in vitro* de yemas axilares de microestacas, 10 días después del cultivo en Medio I
- C) Elongación de yemas axilares de microestacas, 3 semanas después del cultivo en Medio II.
- D) Plántula obtenida de una semilla cultivada *in vitro* 3 semanas después de su germinación en Medio III
- E) Preparación del hipocotilo (patrón) para la microinjertación, mediante un corte longitudinal de aproximadamente 5 mm en su extremo superior
- F) Yema axilar (microexplant) obtenida de brotes elongados de microestacas (C), lista para ser microinjertada en (E)
- G) Introducción del microexplant en la rama longitudinal hecha en el extremo superior del hipocotilo del patrón.
- H) Punta cónica usada para mantener los tejidos del patrón y el microexplant en contacto estrecho durante la microinjertación
- I) Microinjerto aproximadamente 3 semanas después de producido. Yemas obtenidas de microinjertos mantenidos *in vitro* representan la fuente de microexplantos en el proceso de microinjertación cíclica.
- J) Plántulas producidas por microinjertación cíclica mantenidas en invernadero
- K) Microinjerto 14 meses después de sembrado en el campo
- L) Fruto formado por una planta producida por microinjertación, 20 meses después de sembrada en el campo

72

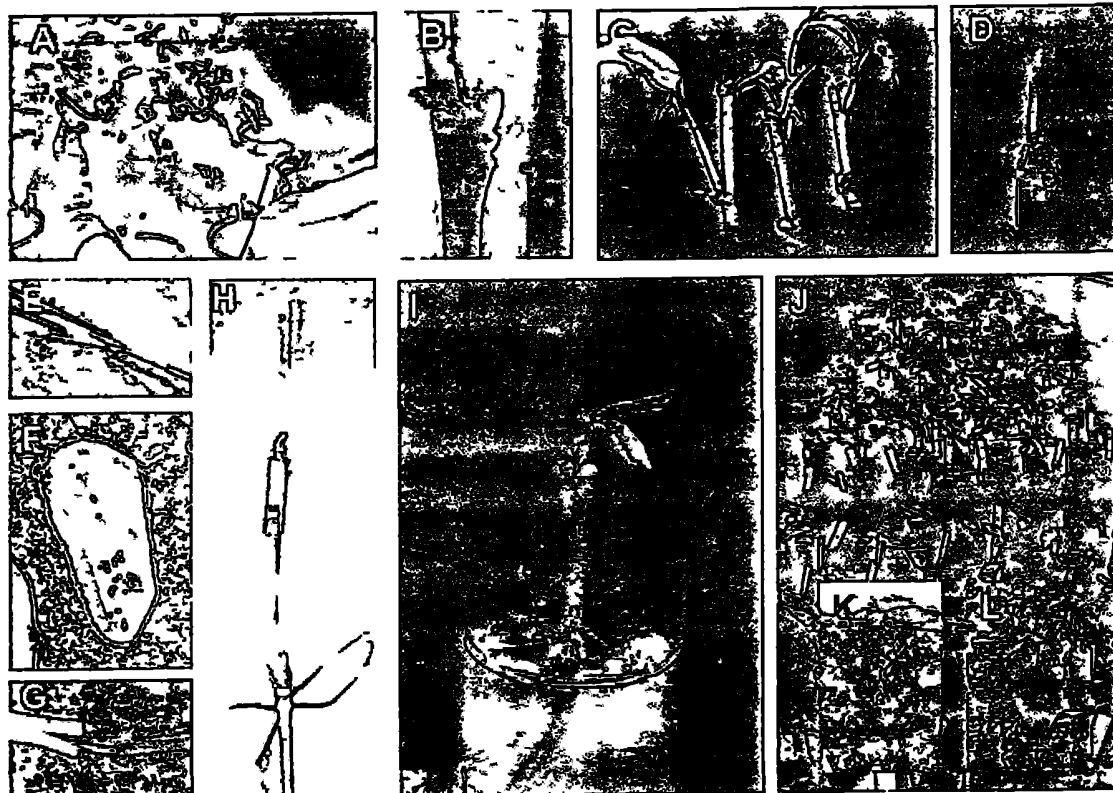


Figura 1 Proceso de propagación clonal *in vitro* de guanábano por microinyección cíclica.

- A) Corte de ramas jóvenes de clones de árboles seleccionados, para la obtención de microestacas con yemas axilares.
- B) Brotación *in vitro* de yemas axilares de microestacas, 10 días después del cultivo en Medio I.
- C) Elongación de yemas axilares de microestacas, 3 semanas después del cultivo en Medio II.
- D) Plántula obtenida de una semilla cultivada *in vitro* 3 semanas después de su germinación en Medio III.
- E) Preparación del hipocotilo (patrón) para la microinyección, mediante un corte longitudinal de aproximadamente 5 mm en su extremo superior.
- F) Yema axilar (microexplant) obtenida de brotes elongados de microestacas (C), lista para ser microinyectada en (E).
- G) Introducción del microexplant en la ranura longitudinal hecha en el extremo superior del hipocotilo del patrón.
- H) Punta cónica usada para mantener los ápices del patrón y el microexplant en contacto estrecho durante la microinyección.
- I) Microinjerto aproximadamente 3 semanas después de producido. Yemas obtenidas de microinjertos mantenidos *in vitro* representan la fuente de microexplantos en el proceso de microinyección cíclica.
- J) Plántulas producidas por microinyección cíclica mantenidas en invernadero.
- K) Microinjerto 14 meses después de sembrado en el campo.
- L) Fruto formado por una planta producida por microinyección, 20 meses después de sembrado en el campo.

LA DIRECCION GENERAL DEL PROTOCOLO

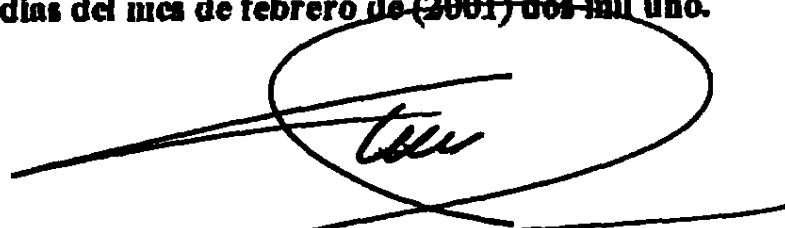
HACE CONSTAR :

Que, el Convenio entre la República de Colombia y el CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT - suscrito en Bogotá D.C., a los cinco (5) días del mes de mayo de mil novecientos ochenta y siete (1987), fue aprobado por el Congreso Nacional mediante Ley 29 de 1988, publicada en el Diario Oficial No. 38.264.

Que el doctor JOACHIM VOSS, se encuentra actualmente acreditado como Director del Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT- desde el 28 de abril de 2000.

La presente se expide a solicitud y con destino al CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL -CIAT- a los nueve (9) días del mes de febrero de ~~(2001)~~ dos mil uno.





CARLOS ALBERTO BERNAL ROMAN
Director General del Protocolo



Señores
 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO - SIC
 Bogotá D.C.

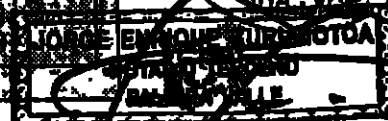
JOACHIM VOSS, mayor de edad, con domicilio en la ciudad de Cali, identificado con el Pase Diplomático No. O200013 expedido por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia, actuando como Director y Representante Legal del CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, organismo internacional con personería reconocida en el convenio celebrado con el Gobierno de Colombia y aprobado por la ley 29 de 1988, a ustedes atentamente manifiesto que por medio del presente escrito confiero poder especial amplio y suficiente al abogado GERMAN ARIAS JARAMILLO, mayor de edad, con cédula de ciudadanía No. 14.993.364 de Cali, y Tarjeta Profesional No. 18.842 del C.S. de la J. para que en nombre de la entidad que represento presente ante ustedes una solicitud de Patente de Invención del "Proceso para la propagación clonal *in vitro* de plantas de guanábano (*Annona muricata* L.) empleando microinjertación cíclica".

Faculto al abogado GERMAN ARIAS JARAMILLO para presentar la documentación requerida para la obtención de la patente, reclamar derecho de prioridad si fuere necesario, sustituir, reasumir, recibir, comprometer, renunciar, interponer recursos, y en general todas aquellas que sean necesarias para el buen y fiel cumplimiento de su gestión.

Atentamente,

JOACHIM VOSS
 Director General

PODERANCIA DE PRESENTACION PERSONAL
 El anterior memorial dirigido a Superintendencia
de Industria y Comercio
 fue presentado por German Arias Jaramillo (u)
 quien es L.C. No. 14993364 Cali C.C. No. GERMAN ARIAS JARAMILLO
 Ante la Notaría del Circuito de Palmira, Poderado
 Fecha - 3 MAYO 2007
 El escriba:



Joachim Voss

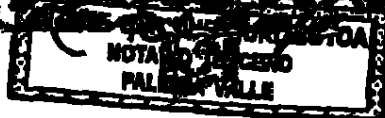
mayor(es) de edad de esta vecindad con cédula(s)

Peru Diplomatic 20012

y dijo (eran) que a las 12:00 horas de la noche y que lo (a)

firma(s) puesta(s) en

mioma (e' uaa(n) y a...

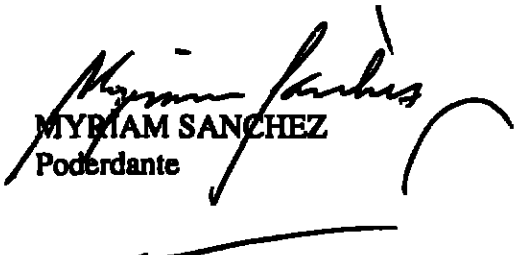


Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO – SIC
Bogotá

MYRIAM SANCHEZ, identificada con la cédula de ciudadanía No. 31.212.595 expedida en Cali, actuando en nombre y representación de La Corporación para el Desarrollo de la Biotecnología – CORPORACION BIOTEC, corporación de participación mixta, sin ánimo de lucro, con personería jurídica reconocida mediante la Resolución No. 1271 del 9 de Agosto de 1995, expedida por la Gobernación del Departamento del Valle del Cauca, la cual acompaño, a usted atentamente me dirijo para manifestarle que confiero poder especial, amplio y suficiente al Abogado GERMAN ARIAS JARAMILLO, quien se identifica con la cédula de ciudadanía No. 14.993.364 de Cali y la Tarjeta Profesional de Abogado No. 18842 de la C.S.J., para que en nombre y representación del CIAT presente ante usted una solicitud de patente de invención conforme a las normas legales del “Proceso de para la Propagación Clonal *in vitro* de Plantas de Guanábano (*Annona muricata* L.), empleando la Microinjertación Cíclica”

Faculto al Abogado GERMAN ARIAS JARAMILLO para presentar toda la documentación requerida para la obtención de la patente, reclamar derecho de prioridad, sustituir, reasumir, recibir, comprometer, renunciar, y en general todas aquella que tiendan al buen y fiel cumplimiento de su gestión.

Atentamente,


MYRIAM SANCHEZ
Poderdante


Acepto: _____
GERMAN ARIAS JARAMILLO
Apoderado

x Myriam Sanchez

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA PUBLICA

AUTENTICACION Y INSTRUMENTO

En Palmar a 26 de Sept de 2007

compareció ante la Notaria Cuarta de esta ciudad
Myriam Sanchez Nieto
C.C. No 21212595
Calle 100 y manifestó que el
presente instrumento es suyo y que la firma y
señal es de su propiedad y que la misma es
verdadera.

x Myriam Sanchez

El presente instrumento se otorgó en
Palmar a las 26 de Sept de 2007

OBJETO:

LA CORPORACION BIOTEC TIENE COMO MISION FUNDAMENTAL, CREAR Y DESARROLLAR CAPACIDAD DE INVESTIGACION, DESARROLLO Y PRODUCCION EN BIOTECNOLIGIA RELACIONADA CON SALUD, ALIMENTOS, MEDIO AMBIENTE Y PRODUCTOS AFINES PARA LA POBLACION COLOMBIANA Y CAPACIDAD DE GESTION Y ENLACE PARA IMPULSAR LA INTERACION ENTRE EL GOBIERNO, LA EMPRESA PRIVADA Y LA COMUNIDAD EN GENERAL A NIVEL NACIONAL O INTERNACIONAL DENTRO DE PARAMETROS DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y DE ACUERDO CON LAS NECESIDADES A CORTO Y LARGO PLAZO DE LA SOCIEDAD.

DEL PATRIMONIO Y LA FORMA DE HACER LOS APORTES:

1. EL CONJUNTO DE TODOS SUS BIENES, DERECHOS DE INDOLE ECONOMICO Y FRUTOS EN LA CARTA DE CONSTITUCION CONSTARA EL APORTE PATRIMONIAL INICIAL DE LA CORPORACION. 2. LA POSESION Y ADQUISICION DE TODA CLASE DE BIENES, AJUSTANDOSE EN SUS ACTOS DE DISPOSICION Y ADMINISTRACION A LAS NORMAS QUE LE SEAN APLICABLES Y DESTINANDO SUS FRUTOS A LOS FINES QUE LE SON PROPIOS, TODO ELLO DE CONFORMIDAD CON LOS PRESENTES ESTATUTOS. 3. LOS INTERESES O BENEFICIOS GENERADOS POR SUS ACTIVIDADES REGULARES. 4. LOS APORTES, AUXILIOS Y TRANSFERENCIAS QUE SE OTORGUEN POR ENTIDADES PUBLICAS DE CUALQUIER ORDEN. 5. LAS DONACIONES, HERENCIAS Y LEGADOS QUE SE OTORGUEN POR PERSONAS NATURALES O JURIDICAS DE CARACTER PRIVADO. 6. CUALQUIER OTRO INGRESO QUE TENGA TAL CARACTER SEGUN ESTOS ESTATUTOS.

FORMA DE ADMINISTRACION:

ASAMBLEA GENERAL. CONSEJO DIRECTIVO. DIRECTOR

FUNCIONES DE LA ASAMBLEA GENERAL:

A. TRAZAR LAS POLITICAS Y LINEAMIENTOS GENERALES PARA EL MEJOR CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DE LA CORPORACION BIOTEC. B. ELEGIR DOS MIEMBROS DEL CONSEJO DIRECTIVO. C. ASESORAR A LA CORPORACION BIOTEC EN LA ELABORACION DE SUS PRESUPUESTOS ORDINARIOS Y EXTRAORDINARIOS, ASI COMO EN LAS CUENTAS Y LIQUIDACIONES GENERALES. D. DESIGNAR LOS MIEMBROS HONORARIOS PREVIA PROPUESTA DEL CONSEJO DIRECTIVO O DEL DIRECTOR. E. APROBAR LA DISOLUCION DE LA CORPORACION BIOTEC, CONFORME A LO DETERMINADO EN LOS PRESENTES ESTATUTOS. F. CONOCER Y COMENTAR EL INFORME ANUAL DE ACTIVIDADES DE LA CORPORACION BIOTEC.

PERIODICIDAD DE LAS REUNIONES:

LA CITACION PARA LAS CONVOCATORIAS SE LLEVARA A CABO CON UN MINIMO DE 15 DIAS DE ANTELACION QUE ASEGURE EL ESTUDIO DE LOS ASUNTOS. PARA EFECTUAR CITACIONES CON UN PLAZO PERENTORIO, SERA CON BASE A LA URGENCIA DE LOS ASUNTOS A TRATAR, DEBIENDOSE, DE TODOS MODOS, ENVIAR LA DOCUMENTACION NECESARIA PARA EL CONOCIMIENTO DE LOS TEMAS. LA CONVOCATORIA SERA REALIZADA POR EL PRESIDENTE O POR LOS MIEMBROS QUE EXTRAORDINARIAMENTE LA CONVOQUEN.

**FUNCIONES DEL REPRESENTANTE LEGAL:
DIRECTOR:**

A. FOMENTAR ACTIVIDADES QUE REALICEN LOS OBJETIVOS DE LA CORPORACION.
B. PROPONER PLANES, PROGRAMAS Y PROYECTOS AL CONSEJO DIRECTIVO.
C. CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS PRESENTES ESTATUTOS Y LOS REGLAMENTOS DE LA CORPORACION BIOTEC, SUJETOS A LAS LIMITACIONES DE LA LEY.
D. ELABORAR EL PROYECTO DE PRESUPUESTO ANUAL Y EL DE INVERSIONES Y GASTOS Y PRESENTARLO A CONSIDERACION Y APROBACION DEL CONSEJO DE DIRECTIVO.
E. CELEBRAR LOS ACTOS Y CONTRATOS QUE SEAN NECESARIOS, PARA LA CORRECTA OPERACION DE LA CORPORACION Y CON AUTORIZACION DEL CONSEJO DIRECTIVO, CUANDO EXCEDAN DE LA CUANTIA QUE ESTE LE SE;ALE.
F. CONTRATAR LOS FUNCIONARIOS QUE LA CORPORACION BIOTEC REQUIERA, VIGILAR SU DESEMPEÑO, RESCINDIR O TERMINAR CONTRATOS Y, GENERAL, DECIDIR SOBRE LOS ASUNTOS LABORALES DE LA MISMA.
G. CONTRATAR LOS SERVICIOS DE PROFESIONALES INDEPENDIENTES Y DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS PARA ADELANTAR LAS ACTIVIDADES DE LA CORPORACION BIOTEC.
H. PRESENTAR, CONJUNTAMENTE CON EL REVISOR FISCAL LOS ESTADOS FINANCIEROS Y LOS BALANCES DE LA CORPORACION BIOTEC.
I. EJERCER LOS DERECHOS QUE CORRESPONDAN A LA CORPORACION COMO TITULAR DE ACCIONES Y DEMAS TITULOS VALORES.
J. LAS DEMAS QUE LE FIJEN LOS PRESENTES ESTATUTOS, O QUE LE ENCOMIENDEN LA ASAMBLEA Y EL CONSEJO DIRECTIVO.

FUNCIONES DEL REVISOR FISCAL:

A. PRESENTAR AL CONSEJO DIRECTIVO, CONJUNTAMENTE, CON EL DIRECTOR, LOS ESTADOS FINANCIEROS Y BALANCES ANUALES DE LA CORPORACION BIOTEC.
B. ASISTIR CON VOZ PERO SIN VOTO A LAS REUNIONES DE LA ASAMBLEA Y DEL CONSEJO DIRECTIVO.
C. REVISAR LOS LIBROS Y ESTADOS FINANCIEROS DE LA CORPORACION BIOTEC Y SUMINISTRAR A LA ASAMBLEA Y AL CONSEJO DIRECTIVO LAS ACLARACIONES O INFORMES QUE LE SEAN SOLICITADAS.
D. ESTABLECER LAS NORMAS DE CONTROL QUE PERMITAN AUDITAR LAS OPERACIONES CONTABLES Y FINANCIERAS DE LA CORPORACION.
E. LAS DEMAS QUE LE ASIGNE LA LEY Y EL CONSEJO DIRECTIVO.

CAUSALES DE DISOLUCION Y FORMA DE HACER LA LIQUIDACION:

LA CORPORACION BIOTEC SE DISOLVERA SI LLEGARE A PRESENTARSE EL CASO PREVISTO EN EL ARTICULO 648 DEL CODIGO CIVIL Y POR VOLUNTAD DE SUS MIEMBROS ACTIVOS. DISUELTA LA CORPORACION BIOTEC, DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN ESTOS ESTATUTOS, SE PROCEDERA A SU LIQUIDACION. DISUELTA LA CORPORACION, SUS BIENES Y EL PRODUCTO DE LOS MISMOS, SERA TRASPASADOS A TITULO GRATUITO A LA UNIVERSIDAD DEL VALLE, UNA VEZ PAGADOS LOS PASIVOS A FAVOR DE TERCEROS. LA LIQUIDACION SERA HECHA POR EL DIRECTOR O POR LA PERSONA O PERSONAS QUE EL CONSEJO DIRECTIVO SE;ALE.

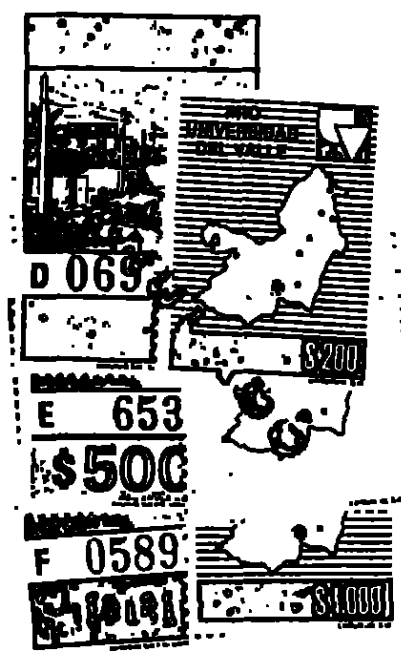
EL PRESENTE CERTIFICADO HISTORICO SE EXPIDE PARA LA CAMARA DE COMERCIO

4.-En constancia de lo anterior se firma en Cali, a los 21 dias del mes de Marzo de 1997.

NOTA: Se adhieren y anulan estampillas Pro_electrificacion Rural \$1.000,00 Pro_Universidad del Valle \$1.000,00 cualquier enmendadura anula el presente certificado.

Gustavo Palomeque Z.

GUSTAVO PALOMEQUE ZORRILLA
JEFE DIVISION ASUNTOS DELEGADOS DE LA NACION (E)



ACUERDO SOBRE DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL EN RELACION CON UN INVENTO

PARTICIPANTES

1. El Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, organismo internacional con sede en Colombia y personería reconocida en el convenio celebrado con el Gobierno de Colombia el 5 de mayo de 1987 y aprobado mediante la Ley 29 de 1988, representado en esta carta de entendimiento por su Director General y Representante Legal, doctor JOACHIM VOSS, quien se identifica con Pase Diplomático No. O-200013 expedido por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia, en adelante denominado EL CIAT.
2. La Corporación para el Desarrollo de la Biotecnología - CORPORACION BIOTEC, corporación de participación mixta, sin ánimo de lucro, con personería jurídica reconocida mediante la Resolución No.1271 del 9 de Agosto de 1995, expedida por la Gobernación del Departamento del Valle del Cauca, representada por su Directora, Myriam Sánchez Mejía, identificada con la Cédula de Ciudadanía No. 31.212.595 de Cali, quien para los efectos de este convenio se denominará la CORPORACION BIOTEC.
3. ALVARO MEJIA JIMENEZ, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 19.405.402 de Bogotá; NELSON ROYERO, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 10.486.967 de Santander, Cauca; JORGE CABRA, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 79.347.400 de Bogotá; WILLIAM M. ROCA, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. mayores de edad, hábiles para contratar y obligarse, quienes en este acuerdo se denominarán los INVENTORES.

Entre el CIAT y la Corporación BIOTEC de una parte, y de otra, los INVENTORES antes mencionados, se ha llegado a un acuerdo sobre las condiciones que rigen el registro de una patente sobre un invento, el cual se registrará conforme a los siguientes puntos:

1. Título del Invento. "Proceso para la propagación clonal *in vitro* de plantas de guanábano (*Amorpha muricata* L.), empleando microinyección cíclica".
2. Resumen del Invento. Las técnicas convencionales de multiplicación *in vitro*, en las cuales los propágulos son cultivados en contacto directo con el medio de cultivo, sobre él o sumergidos en él, no han sido eficientes en la propagación del guanábano. El proceso revelado en la presente invención, que denominamos microinyección

34

cíclica *in vitro*, es diferente de los anteriores en los siguientes aspectos: el tejido para micropropagar, que consiste en un microexplante proveniente de un árbol adulto seleccionado o un clon de éste, y que contiene una yema preexistente, no entra en contacto directo con el medio de cultivo sino que se alimenta de él a través de un portainjerto sobre el cual ha sido microinjertado. El portainjerto puede provenir de una semilla germinada *in vitro* de la misma especie del microexplante o de otra especie de anonácea. El microinjerto se cultiva en condiciones relativamente simples y apropiadas para el desarrollo de la yema preexistente en el microexplante.

Se generan así, en promedio, 3.7 nuevas yemas por microinjerto cada 6 semanas, de las cuales pueden obtenerse también otros microinjertos. El uso de técnicas mejoradas de microinjertación permite que premlan, en promedio, 75% de los microinjertos. La operación puede repetirse cuantas veces sea necesario hasta obtener el número deseado de microinjertos, los cuales, después de una fase de endurecimiento y aclimatización —primero *in vitro* y luego en un invernadero—, producen árboles que se desarrollan normalmente una vez sembrados en el campo.

Este proceso es útil para la producción masiva *in vitro* de clones libres de enfermedades a partir de árboles adultos seleccionados de guanábano.

3. **Recursos con los cuales se obtuvo el invento.** Los recursos con los cuales se produjo el invento fueron aportados por el CIAT y la Corporación BIOTEC en desarrollo del convenio especial de cooperación que ambas instituciones celebraron el 24 de mayo de 1999. En estos se comprende los equipos de laboratorio, infraestructura técnica y científica, materiales de información tecnológica, servicios de biblioteca y documentación, terrenos para investigación, redes de información, acceso a información técnica internacional, equipos de trabajo multidisciplinarios y otras fuentes de recursos materiales, humanos y tecnológicos requeridos para la producción de la invención.

Los inventores aportaron toda su capacidad intelectual, científica, sus conocimientos, habilidades y destrezas para la obtención de la invención.

4. **Derechos de Propiedad sobre el Invento.** El invento mencionado anteriormente fue obtenido por los inventores, quienes fueron contratados por el CIAT y la Corporación BIOTEC para investigar, por lo cual la invención le pertenece al CIAT y a la Corporación BIOTEC, de acuerdo con las normas legales vigentes y de acuerdo con la política que rige internamente en estas instituciones.

Consecuente con lo anterior, el CIAT y la Corporación BIOTEC serán los titulares y beneficiarios de la patente sobre la invención realizada y podrán efectuar todos los trámites que correspondan o sean necesarios en cualquier país del mundo para

obtener el registro o la concesión de la patente conforme a las normas legales que rijan en el respectivo país.

De igual forma, el CIAT y la Corporación BIOTEC podrán ejercer todos los derechos de propiedad sobre la patente y efectuar los acuerdos que consideren necesarios, de acuerdo con sus políticas internas, con instituciones o personas públicas o privadas, nacionales o internacionales en los que se establezcan las condiciones para la utilización de la invención, así como obtener regalías, derechos, participaciones o cualquier otra clase de beneficio económico, resultante de la utilización de la invención.

El CIAT y la Corporación BIOTEC pondrán a disposición de su personal científico, de la comunidad internacional científica, o de la comunidad en general la invención, con el fin de que se haga uso de ella o se aplique conforme a su política de permitir el libre acceso de su tecnología al mundo en general para contribuir de esta forma al desarrollo agrícola.

El CIAT y la Corporación BIOTEC podrán continuar trabajando conjunta o separadamente en proyectos o actividades de investigación utilizando el invento y la tecnología en ella incorporada, de tal forma que a partir de dicha tecnología puedan obtenerse nuevos resultados, transformaciones, modificaciones, o desarrollos de la invención.

5. **Derechos de los Inventores.** Los inventores tendrán derecho a que figure su nombre en las patentes que se registren o se soliciten en cualquier parte del mundo por parte del CIAT y de la Corporación BIOTEC.

Igualmente, los inventores tendrán derecho a que figure su nombre en cualquier publicación o documento referente a la invención.

Teniendo en cuenta que los inventores fueron contratados por el CIAT y la Corporación BIOTEC para investigar (NELSON ROYERO y JORGE CABRA contratados por la Corporación BIOTEC, WILLIAM M. ROCA contratado por el CIAT y ALVARO MEJIA JIMENEZ, contratado por el acuerdo de cooperación CIAT-Corporación BIOTEC) y de acuerdo con la política interna de las instituciones sobre derechos de propiedad intelectual, los inventores declaran conocer y acogerse integralmente a su contenido y utilidad, el invento no implicará ningún derecho económico o compensación a favor de los inventores por parte del CIAT y/o de la Corporación BIOTEC.

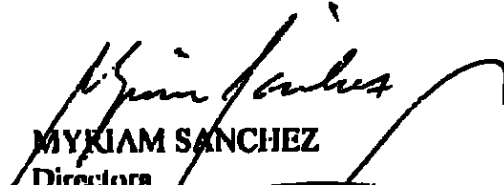
6. **Duración de este acuerdo y alcance de sus efectos.** La duración de este acuerdo y de los derechos contenidos en él serán de carácter indefinido.

Para constancia se firma por los participantes a los quince (15) días del mes de septiembre del 2000.

EL CIAT


JOACHIM VOSS
Director General

CORPORACION BIOTEC


MYRIAM SANCHEZ
Directora

LOS INVENTORES


ALVARO MEJIA JIMENEZ


NELSON ROYERO


JORGE CABRA


WILLIAM M. ROCA



37

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 81037948 00500000
Fecha (RND): 2001-05-08 15:10:40
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAL
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 37

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 28,365
FECHA : MAYO 8 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CIAT.	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2750665	08/05/2001	356,640.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
	TOTAL :	\$ 356,640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

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

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
 Radicación : 01033948 00000000
 Fecha (AÑO): 2001-05-08 15:10:40
 Trámite : 002 PATENTES D I REGISTRO/ 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
 Conmutador: 334 12 21-2-3-4
 Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
 Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
GERMAN ARIAS JARAMILLO
Apoderado de CIAT

REFERENCIA:	Radicación No.	01-35948
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1707
	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:

Teniendo en cuenta que el documento que acredita la existencia y representación legal de la Corporación para el Desarrollo de la Biotecnología -CORPORACION BIOTEC-, presentado con la solicitud, en su numeral segundo, declara que el período de la Señora Miryam Sánchez Mejía se encuentra vencido desde "los 08 días del mes de Febrero de 1998 y que hasta el momento no se ha actualizado la documentación por parte de la entidad.", es imposible para ésta Oficina reconocer personería al abogado como apoderado de dicha Corporación. Por lo anterior, debe allegarse el documento actualizado que acredite la existencia y representación legal de dicha Corporación.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, 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 artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 07 JUN. 2001.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia