



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark
Patent
Health Permit
C. 1000000

Marcas
Patentes
Registros Sanitarios
Serpente Lógico

Comerciales

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-058107- -00002-0000

Fecha: 2008-09-17 16:19:48 Dep. 2020 NUECREACIONE
Ira. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 593 IMPULSOPROCESAL Folios: 1

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

REF: EXPEDIENTE:

PATENTE DE INVENCION: "MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALISO ANDINO"

ACTUACIÓN: IMPULSO PROCESAL

Estimados señores:

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, identificado como aparece al pie de firma, obrando como apoderado especial de la **"UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA"**; según poder que reposa en el expediente de la referencia, comedidamente solicito a usted la revisión respecto al trámite administrativo que nos ocupa, ya que la **última actuación que tenemos es la Petición de Examen de Patentabilidad el cual fue radicado ante su despacho el 23/04/2007**, como han transcurrido mas de **DIECISIETE (17) meses** sin que se hayan pronunciado al respecto, ruego a usted ordenar lo pertinente, para que éste se realice.

Por lo tanto solicito **impulso procesal** para que se continúe el curso de dicha solicitud. Agradecemos que cualquier comunicación se reciba en la secretaría de su Despacho o en nuestras Oficinas ubicadas en la Carrera 13A No. 28-38 Bufete 245 Mz.2 Parque Bavaria, Bogotá D.C.

Con toda atención

CARLOS MAYA RODRÍGUEZ

C.C. No.17.117.818 de Bogotá
T.P. No 17.402 del C.S.J.

MOLECULAR ANALYSIS OF MICROPROPAGATED NEEM PLANTS USING AFLP MARKERS FOR ASCERTAINING CLONAL FIDELITY

A. SINGH¹, M. S. NEGI¹, V. K. MOSES², B. VENKATESWARLU², P. S. SRIVASTAVA³, AND M. LAKSHMIKUMARAN^{1*}

¹Plant Molecular Biology Division, Tata Energy Research Institute, Habitat Place, Lodhi Road, New Delhi 110 003, India

²Central Research Institute for Dryland Agriculture, Santoshnagar, Hyderabad, 500059, India

³Center for Biotechnology, Faculty of Science, Hamdard University, Hamdard Nagar, New Delhi, 110062, India

(Received 10 December 2001; accepted 27 May 2002; editor C. J. Chetsanga)

SUMMARY

The importance of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) as a medicinal tree species has been acknowledged worldwide. Superior trees with desired traits such as high azadirachtin content have been identified and micropropagated. Somaclonal variants that may arise *in vitro*, however, pose limitations to large-scale micropropagation. It is, therefore, imperative to establish genetic uniformity of such plantlets by ensuring strict quality checks at various stages of *in vitro* culture. This is the first study that evaluates the applicability of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in establishing clonal fidelity of tissue culture (TC)-raised neem plants. Seven AFLP primer combinations generated a total of 334 amplified fragments across the mother plant, TC progenies, and other neem accessions that were included as controls. Two hundred and thirty-nine amplified fragments were monomorphic across the mother tree and its TC progenies. No extra band was detected in the TC plantlets that was absent in the mother tree, indicating that the TC plantlets regenerated through nodal explants are indeed true-to-type. Ninety-five AFLP fragments were detected in the controls, which allowed their discrimination from the elite mother tree and its TC progenies. Similarity matrix based on Jaccard's coefficient revealed that the pair-wise value between the mother tree and its TC plantlets was '1', indicating perfect similarity. Phenetic dendrogram based on UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic averages) analysis further confirmed the true-to-type nature of TC progenies, since a tie was observed between the mother tree and its TC plantlets. On the contrary, the control neem accessions were distinct from the mother and its TC progenies. AFLP markers proved to be an ideal tool for routine analysis and certification of genetic fidelity of micropropagated plants prior to commercialization, especially in tree species because of their long generation time.

Key words: tissue culture; genetic fidelity; *Azadirachta indica*; molecular markers.

INTRODUCTION

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), a member of the Meliaceae, is a multipurpose tree species native to the Indian sub-continent and Myanmar. It is endowed with a number of medicinal and biopesticidal properties. More recently, neem has received international recognition owing to the increasing demand for a number of bioactive chemicals that are present in its kernel, leaves, and bark (Schmutterer, 1995), one of them being azadirachtin. This compound has been characterized extensively for its insecticidal properties which mainly stem from its antifeedant and growth-regulating effects (Schmutterer, 1995). The growing demand for azadirachtin has prompted scientists to determine its content in naturally growing trees. This has led to the identification and selection of superior individuals (plus trees), that are endowed with high azadirachtin content (Ganeshkumar et al., 1994; Rangaswamy and Paramar, 1995; Venkateswarlu et al., 1997). Studies have also been undertaken to assess the genetic variation and identify elite

individuals in this medicinal tree for improvement programs. Our earlier studies, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, have revealed a large genetic variation in provenances collected from 10 different states of India (Singh et al., 1999). However, neem is a natural out-breeder and produces highly heterozygous progenies. Thus, it becomes meaningful to micropropagate the plus trees through tissue culture practices even though vegetative propagation and tissue culture methods have been optimized to produce true-to-type planting material in neem (Pal, 1995; Venkateswarlu et al., 1998). Somatic embryos have been initiated from mature seeds in neem (Murthy and Saxena, 1998). Micropropagated shoots have also been initiated from leaf explants (Eeswara et al., 1998).

It has been extensively reported that tissue culture-induced genetic variations (somaclonal variations) are quite common in clonally propagated plants (Larkin and Scowcroft, 1981; Earle and Demarly, 1982). Somaclonal variations can pose a severe threat to the genomic integrity of regenerated plants. Since the sustainability of the micropropagation technique is dependent upon the maintenance of genetic fidelity of the regenerants, several strategies have been adopted to analyze the genetic fidelity of the TC-raised

*Author to whom correspondence should be addressed: Email malaks@teri.res.in

progenies. Rigorous examination becomes all the more critical for perennials such as tree species where the reproductive cycle is long.

DNA-based markers provide an efficient way for screening TC-induced mutations since these markers are not affected by environmental factors and present more reliable and reproducible results. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers have been utilized extensively for ascertaining the clonal fidelity of micropropagated plantlets (Shenoy and Vasil, 1992; Kidwell and Osborn, 1993; Nelke et al., 1993). PCR-based markers such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) have also been used for detecting off-types from micropropagated plants such as rose (Matsumoto and Fukui, 1996) and sugar beet (Munthali et al., 1996), and for ascertaining the clonal fidelity in *Lilium* (Varshney et al., 2000), turmeric (Salvi et al., 2001), and peach (Hashmi et al., 1997). Inter simple sequence repeat (ISSR) markers have been used for establishing the genetic fidelity in horseradish (Rostiana et al., 1999) and in cauliflower to assess the stability of regenerants (Leroy et al., 2000). AFLP, a recently developed molecular marker, has now become a preferred technique as it combines the reliability of RFLP with the efficiency of RAPD (Vos et al., 1995). This excellent technique has been used for analyzing the genetic variation in pecan somatic embryoids (Vendrame et al., 1999).

In the present study, an elite neem tree was micropropagated according to the protocol described by Venkateswarlu et al. (1998) involving culture of nodal explants followed by axillary shoot multiplication. The objective of the study was to ascertain clonal fidelity of these micropropagated neem plantlets by employing AFLP marker techniques to verify the trueness of type in micropropagated plants of this long-lived tree.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. The selected mother plant for micropropagation is a 14-yr-old plus tree naturally growing at the Hayathnagar Research Farm of CRIDA (Central Research Institute for Dryland Agriculture), Hyderabad (Andhra Pradesh). It contains 0.6% azadirachtin, 43% oil in kernels, 9 g per 100 seed average weight, 40 kg air-dried average fruit yield per yr, 2.4 m straight bole, and is tolerant to the partial stem parasite *Loranthus*. The progenies were raised through tissue culture according to the protocols described by Venkateswarlu et al. (1998). The procedure briefly involved culturing of nodal explants from the juvenile shoots of the mother tree, axillary shoot multiplication *in vitro*, rooting *ex vitro* in artificial substrate, and hardening off in the greenhouse. When plants were 6 mo. old, young leaf

material was collected and used for DNA extraction. For the present work, one elite mother plant (accession A, as described above) along with nine randomly selected TC-raised progenies (accessions B–J) were analyzed. In addition, six Indian accessions (K–P) and two Thai accessions (Q, R) were included as controls for the analysis. The characteristics of the four controls from Hyderabad are given below. Accession K is another plus tree with very high fruit yield (80–100 kg yr⁻¹) even in drought seasons. It is characterized as having 0.7% azadirachtin, 43% oil, and has 135 cm girth at breast height (GBH). Accession L is a 20-yr-old mature plus tree with a very high azadirachtin content of 0.85% but is highly susceptible to *Loranthus*. Accessions M and N are characterized by moderate to low levels of azadirachtin, 0.5% and 0.3%, respectively.

DNA extraction and AFLP analysis. Total genomic DNA was isolated from young leaves using a modified CTAB method (Doyle and Doyle, 1990). The AFLP protocol employed is based on the protocol developed by Zabeau and Vos (1993) with some minor modifications (Das et al., 1999). Briefly, genomic DNA (300 ng) was restricted with *EcoRI* and *MseI* followed by ligation with *EcoRI* and *MseI* specific adaptors. Pre-amplification of the adapter-ligated DNA was performed using A and C as selective nucleotides (*EcoRI* + A and *MseI* + C, respectively). Cycling parameters employed were as follows: 20 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 56°C, and 60 s at 72°C. For selective amplification, the pre-amplified library was diluted 50-fold and used as template DNA. *EcoRI* and *MseI* primers with three selective bases at the 3' end were employed for selective amplification. For detection, *EcoRI* + 3 primer was end-labeled. The following cycling parameters were utilized for selective amplification: 1 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, and 72°C for 60 s. Starting from 65°C, the annealing temperature was reduced by 0.7°C per cycle during the first 12 cycles, and then 23 cycles were performed at 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 60 s. The samples were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and autoradiographed according to the standard conditions (Zhu et al., 1998).

Data analysis. The size of amplification products generated with seven primer combinations (Table 1) ranged from 50 to 350 bp. The AFLP amplification products were scored for their presence (1) and absence (0) across the 18 individuals tested. The genetic similarity (GS) between pairs was estimated according to Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908, $GS_{ij} = a/(a+b+c)$, where GS_{ij} is the measure of genetic similarity between individuals *i* and *j*, *a* is the number of polymorphic bands shared by *i* and *j*, *b* is the number of bands present in *i* and absent in *j*, and *c* is the number of bands present in *j* and absent in *i*). The statistical analysis was carried out using the NTSYS-pc software (version 2.0, Rohlf, 1998). The phenetic dendrogram was constructed by employing UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic averages; Sneath and Sokal, 1973) in order to group individuals into discrete clusters.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study aimed at ascertaining the genetic uniformity of the nuclear genome of the mother plant and its TC-raised progenies, in order to establish true-to-type character by employing the AFLP

TABLE 1
INFORMATION OBTAINED FROM VARIOUS PRIMER COMBINATIONS

Primer combination used	Total number of amplification products	Total number of amplification products in the mother and the tissue culture progeny	Total number of amplification products in negative controls which are absent in the mother and the tissue culture progeny
E-ACG × M-CAG	54	37	17
E-ACC × M-CAA	49	35	14
E-AAC × M-CTT	61	39	22
E-ACC × M-CTT	48	39	9
E-ACG × M-CAC	35	26	9
E-ACT × M-CAT	37	26	11
E-AAC × M-CAG	50	37	13
Total	334 (mean = 47)	239	95

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

Abogado

Carlos Orlando Maya Rodríguez

ASUNTO	Radicación	05-58107
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	
	Folios	6

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☒

Vía PCT (fase nacional) ☐ Cap. I ☐ Cap. II ☐

Fecha de Presentación Nacional. 15/06/2005

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 9 a 22 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios: 23 a 28 como se radicó inicialmente.

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Método para la detección de la estabilidad genética de embriones somáticos de Aliso andino".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en suministrar un método para evaluar por medio de AFLPs la estabilidad genética de plantas de Aliso andino (*Alnus acuminata* spp *acuminata*), regeneradas a partir de embriones somáticos.

El problema planteado en esta solicitud es la variación genética e inestabilidad genética que pueden presentar las especies arbóreas que son regeneradas a partir de cultivo de tejidos a partir de embriones somáticos o por organogénesis en general.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un método que permite detectar la estabilidad genética del material de *Alnus acuminata* subespecie *acuminata* a partir de embriogénesis somática.

IPC: A01H 1/04; A01H 5/10; C12N 15/66.

3. De la solicitud de Patente

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de concisión y claridad por cuanto:

- 1) A lo largo de todo el capítulo reivindicatorio se evidencia que la materia que se pretende proteger corresponde a la estandarización de una técnica ampliamente conocida, como son los marcadores AFLPs, para determinar la estabilidad genética de embriones de Aliso andino. Varias reivindicaciones se limitan a presentar las condiciones específicas con las cuales se realiza un protocolo experimental conocido, como es: extracción de DNA (reivindicación 5), digestión y ligación en AFLP (reivindicación 10-14), amplificación (reivindicación 15,17-19), visualización en geles de agarosa (reivindicación 16), visualización y tinción de geles de acrilamida (reivindicaciones 20-28).
- 2) Una etapa de la reivindicación principal y algunas reivindicaciones dependientes (29-32) hacen referencia a métodos estadísticos o de análisis filogenético que permiten analizar los resultados obtenidos, pero que no corresponden a características técnicas esenciales de la invención.
- 3) Las reivindicaciones 9 y 26 mencionan kits y marcas comerciales, este tipo de información no se debe incluir en las reivindicaciones.
- 4) La reivindicación 33 trata sobre el objeto de la invención o el resultado que se pretende alcanzar con la misma.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

4. No es una invención (artículo 15 D486 literal a)

Las reivindicaciones 8 y 32 tratan sobre ecuaciones con las cuales se realiza un cálculo particular, debido a que las ecuaciones matemáticas no son materia que se considere una invención, así como también que estas ecuaciones no han sido desarrolladas por el inventor sino que son métodos de cálculo ampliamente utilizados en la técnica, no pueden ser consideradas como objeto patentable.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en el artículo 15 de la Decisión 486 el contenido de las citadas reivindicaciones deberá excluirse.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:
Fecha de presentación de la solicitud 15/06/2005.

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Gonzaga L. Scientia et Technica Año X, No 25, pp 285-289.	"Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de Aliso <i>Alnus acuminata</i> H.B.K."	Ago/2004
D2	A. Singh <i>et.al.</i> In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38:519-524	"Molecular analysis of micropropagated Neem plants using AFLP markers for ascertaining clonal fidelity"	Sep/2002

El Documento de Gonzaga L (D1) aunque hace parte del estado de la técnica no será tenido en cuenta como anterioridad debido a que se trata de un documento realizado por el inventor de la solicitud, el cual fue divulgado durante el año anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud.

6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

6.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La solicitud divulga un método que permite la detección de la estabilidad genética a partir de embriogénesis somática del material obtenido de *Alnus acuminata* subespecie *acuminata*, a partir del uso de marcadores AFLPs (reivindicaciones 1 a 32)

El documento de Singh *et.al.* (D2), divulga un análisis de valoración de fidelidad o estabilidad clonal de micropropagados de plantas de Neem, usando marcadores moleculares AFLPs. Teniendo en cuenta que:

- El documento D2 también toma material vegetal a partir de micropropagados, tales como explantes de raíz, yemas axilares y apicales, que presentan inestabilidad genética debido al proceso de desdiferenciación que representa la formación de callo (ver pág 520, columna izq);
- También se utilizan métodos de extracción de DNA y AFLPs para la valoración de la estabilidad clonal (ver pág 520, columna derecha);
- Las enzimas a partir de las cuales se realiza la digestión del DNA vegetal son las mismas, una combinación de enzimas MseI y EcoRI (ver pag 520, columna derecha);

Las diferencias entre D2 y la solicitud en estudio son dos:

- 1) la especie sobre la cual se realiza la valoración de la estabilidad genética, puesto que D2 trabaja con *Azadirachta indica*, mientras que la solicitud lo hace con *Alnus acuminata* subespecie *acuminata* en ambos casos se trata de especies arbóreas.

Sin embargo, la estandarización de una técnica ya conocida, tal como son los AFLPs para valorar la estabilidad genética, aplicada a una especie en particular únicamente requiere determinar las condiciones particulares en las cuales se puede realizar un protocolo. Por tanto, una estandarización se considera una actividad que carece de nivel inventivo.

- 2) El material vegetal a partir del cual se realiza la propagación, puesto que en D2 se realiza a partir de explantes de raíz, yemas axilares y apicales, mientras que en la solicitud se hace a partir de callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero o árboles adultos.

Sin embargo, el material a partir del cual se realiza la propagación no representa ni un cambio sustancial en la técnica ni da lugar a un efecto técnico, puesto que en ambos casos se logra el mismo objeto: regenerar la planta (con mayor o menor variabilidad genética) de la cual se toma el material a partir del cual se extrae el DNA.

Como se observa, el método planteado en la solicitud consiste en una estandarización de una técnica conocida (uso de marcadores AFLPs), que además ya ha sido empleada para solucionar el mismo problema técnico. Por tanto, el método planteado en la solicitud es una derivación obvia del estado de la técnica.

De esta manera, el método reclamado carece de actividad inventiva de acuerdo con lo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D2	A. Singh <i>et.al.</i> In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38:519-524	1-33	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
 Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

CONCEPTO TÉCNICO No. 1516	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---