



No. 13-116147- -00002-0000

Fecha: 2013-09-03 15:26:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 120

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

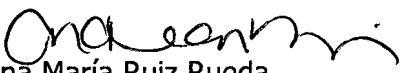
Ref.: Expediente No. 13 116147
Solicitud de registro de patente de Invención PROCESO PARA EL
DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE"
Solicitante: DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY

Ana María Ruiz Rueda, identificada como aparece al pie de mi firma y obrando en mi condición de apoderada de la sociedad DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY, me permito adjuntar:

1. Copia auténtica del Poder a mi conferido, debidamente traducido, donde se me habilita para actuar en nombre y representación del solicitante. Nos permitimos solicitar a este despacho se sirva tener en cuenta que por un error involuntario se mencionó en la solicitud inicial el nombre de la compañía solicitante como DEL MONTE FRESH PRODUCE cuando en realidad es **DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY**.
2. Documento donde consta la cesión del derecho al registro de la patente de invención al solicitante firmado por los señores **Ebrahim Firoozabady; Thomas Young** debidamente traducido.
3. Copia auténtica del documento de prioridad correspondiente a la patente de los Estados Unidos No. **13/507,101** de fecha 4 de Junio de 2013.

En virtud de lo anterior, solicito a ese Despacho proceder a ordenar la publicación de la patente en referencia.

Atentamente,


Ana María Ruiz Rueda
C.C. 39.790.288 de Bogotá
T.P. 84.909 C.S.J.
AMR/amg
F. P-713

Una copia a blanco y negro de este documento no es oficial.

Estado de Florida

Departamento De Estado

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 de 1961)

- País: Estados Unidos de América
- Este documento público
- ha sido firmado por Elizabeth N. Mills
- Actuando en calidad de Notario Público de Florida
- Lleva el sello/timbre del Notario Público, Estado de Florida

CERTIFICA

- en Tallahassee, Florida
- el Veintidós de julio, 2013
- por Secretario de Estado, Estado de Florida
- No. 2013-91418
- Sello/timbre:
- Firma:

(Aparece Sello: Gran Sello del Estado de Florida En Dios Confiamos) (Aparece firma: Secretario de Estado)

DSDE 99 (2/12)

Este documento contiene una marca de agua real. Sosténgalo a la luz para ver "SAFE" y "VERIFY FIRST".

Aparece Poder en Español de DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY, del día 16 de julio, 2013

State of Florida



Department of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by Elisabeth N. Mills

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

6. the Twenty-Second day of July, A.D., 2013

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2013-91418

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Ken Detmer

Secretary of State

DSDE 99 (2/12)

This document contains a true watermark. Hold up to light to see "SAFE" and "VERIFY FIRST."

The word "VOID" appears when photocopied.

"State of Florida" appears in small letters across the face of this 8 1/2 x 11" document.

Poder

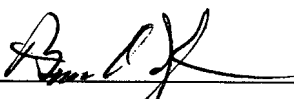
En la ciudad de Miami, Estado de Florida, Estados Unidos de América, a los dieciséis (16) días del mes de Julio, del año dos mil trece (2013), yo **Bruce A. Jordan** en mi calidad de Vice Presidente, Abogado General y Secretario de la compañía DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY, sociedad legalmente constituida bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en doscientos cuarenta y uno, Avenida Sevilla, Coral Gables, Florida, Estados Unidos de América, en el carácter indicado,

Otorgo poder especial pero amplio y suficiente a los doctores **Dario Cárdenas Navas y/o Luz Helena Adarve Gómez y/o Juanita Acosta-Gómez y/o Ana María Ruiz-Rueda**, abogados titulados de la firma CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PROPIEDAD INTELECTUAL LTDA., con domicilio en la Carrera 7a. No. 71-52, Torre B, Piso 9, de Bogotá, D.C., Colombia, para tramitar conjunta o separadamente ante las oficinas y autoridades nacionales de Colombia que correspondan la obtención de registros sanitarios, el registro de marcas, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, depósitos de nombres comerciales y enseñas, así como la tramitación de renovaciones, cesiones, cambios de nombre o domicilio del titular, renunciaciones y licencias de los mismos, cancelaciones de marcas, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, formular descripciones, enmiendas, oposiciones, observaciones y apelaciones, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todos los demás pagos determinados por la ley; recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo; llenar cualesquier otros requisitos y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de todos los derechos de propiedad industrial e intelectual de la compañía en caso de producirse infracciones, piratería, oposiciones, juicio de cancelación, nulidad, etc., pasando los antecedentes a los tribunales; quedan facultados para tomar intervención como demandantes o como demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transigir, someter a árbitros, desistir, percibir, apelar y todas las demás facultades legales que resulten necesarias, y por el presente declara desde ahora válido y bueno cuanto dichos apoderados hicieren en su beneficio, dándoles asimismo facultad para renunciar y sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Que el objeto para el cual este poder se confiere está incluido en aquellos que constituyen el objeto social de la mencionada compañía.

Que para los efectos de los artículos 597 y 543 del Código de Comercio Colombiano los apoderados quedan facultados para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY

Por: 
Nombre: Bruce A. Jordan
Cargo: Vice Presidente, Abogado General y Secretario
Fecha: 16 de julio 2013

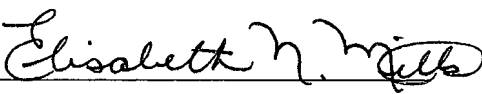
ESTADO DE FLORIDA)
) ss:
CONDADO DE MIAMI-DADE)

El instrumento precedente fue reconocido este 16 día de julio de 2013 por Bruce A. Jordan, Vice Presidente, Abogado General y Secretario de Del Monte Fresh Produce Company (la "Compañía") a quien conozco personalmente y quien firmo dicho documento a nombre de la Compañía.

STATE OF FLORIDA)
) ss:
COUNTY OF MIAMI-DADE)

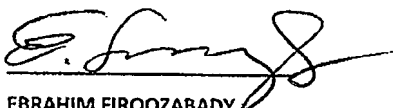
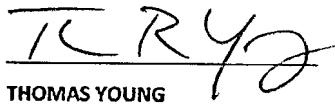
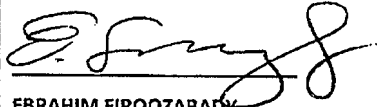
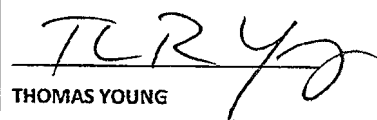
The foregoing instrument was acknowledged before me this 16th day of July 2013 by Bruce A. Jordan, Vice President, General Counsel and Secretary of Del Monte Fresh Produce Company (the "Company") who is personally known to me and who signed the foregoing instrument on behalf of the Company.



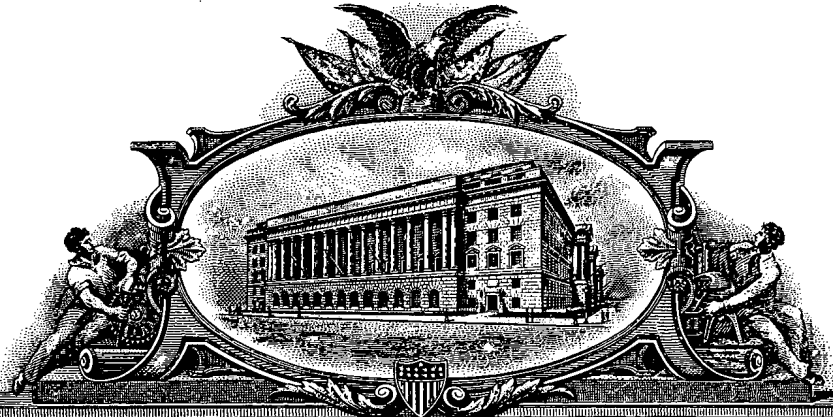

Elisabeth N. Mills, Notary Public

CESIÓN DE PATENTE	ASSIGNMENT AGREEMENT
Los suscritos EBRAHIM FIROOZABADY, de nacionalidad estadounidense; con pasaporte de su país número 218157773 y THOMAS R YOUNG, de nacionalidad estadounidense, con pasaporte de su país número 488752588 en adelante "LOS CEDENTES", por este acto ceden irrevocablemente la invención que se dirá a favor de la empresa DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY, domiciliada en el 241 Avenida Sevilla, Coral Gables, Florida, Estados Unidos de América, en adelante "LA CESIONARIA". La presente CESIÓN DE PATENTE se registrará bajo la legislación vigente y las siguientes cláusulas: PRIMERO. Objeto. "LOS CEDENTES" han inventado cierto objeto nuevo y útil ("La Invención") y tiene una patente en proceso de registro relacionada con dicho objeto, ("La Patente"; y ante interés demostrado de "LA CESIONARIA" desea ceder enteramente los derechos, título e interés de la Invención y la Patente a favor de "LA CESIONARIA". La patente y la invención vinculada se denomina así: PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA ROSÉ. SEGUNDO. Cesión. Por la presente, LOS CEDENTES ceden irrevocablemente a la Cesionaria todos los derechos, título e interés que ostente sobre la patente, el derecho de patente, todos los derechos para preparar trabajos derivados, el fondo de comercio y demás derechos que pertenezcan o estén vinculados a La Patente y La Invención. TERCERO. Declaraciones y Garantías de LOS CEDENTES para con la Cesionaria. a) LOS CEDENTES tienen derecho, poder y autoridad para celebrar este Acuerdo.	The undersigned EBRAHIM FORROZABADY, a US citizen, bearer of the passport number 218157773, and THOMAS R YOUNG, a US citizen, bearer of the passport number 488752588, hereinafter the "ASSIGNORS", hereby irrevocably assigns all of his rights and obligations in regards to the invention to DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY, domiciled at 241 Sevilla Avenue, Coral Gables, Florida, United States of America, hereinafter "ASSIGNEE". The following ASSIGNMENT AGREEMENT will act in accordance with the established by law, and the following clauses: FIRST. Object. The "Assignors" have invented a new and useful invention ("The Invention") and has a patent in the process of being registered, regarding such invention ("The Patent"); and as a result of the "Assignee's" interest, the "Assignors" wishes to assign the rights, title and interest of the Invention and the Patent on behalf of the "ASSIGNEE". The patent and the invention's name is the following PINEAPPLE PLANT NAMED ROSÉ SECOND. Assignment. The Assignors irrevocably assigns all the right, title and interest he has over the patent, the right to the patent, all the rights to prepare derivative works, and any other rights that belong or are linked to the Patent and the Invention. THIRD. Representations and Warranties. a) The Assignors have the full power and authority to make this agreement. b) The Assignors are the exclusive owners of all right, title and interest, including all intellectually property rights derived from the Patent and Invention.

b) LOS CEDENTES son los dueños exclusivos de todo derecho, título e interés, incluso todos los derechos de propiedad intelectual, de la Invención y la Patente. c) La Invención y Patente están libres de todo derecho de retención, prenda, gravamen o licencia. d) La Invención y Patente no violan los derechos de persona o entidad alguna. e) No existen demandas pendientes, ni existirán, con respecto a los derechos de LOS CEDENTES sobre la Invención y la Patente. f) Este Acuerdo es válido, vinculante y vigente de acuerdo con sus términos. g) LOS CEDENTES no quedan sujeto a ningún otro acuerdo, juicio u orden contraria a los términos de este Acuerdo. h) La Cesionaria puede registrar, ceder, licenciar, vender, explotar, reproducir, mejorar y de cualquier forma disponer de la propiedad intelectual de la invención y de la patente en nombre propio o autorizando a terceros, sin ninguna restricción. CUARTO. Acuerdo. Esta Cesión constituye el acuerdo y el pleno entendimiento de LOS CEDENTES con respecto del objeto en cuestión y garantiza a la Cesionaria pleno uso exclusivo de la patente en los términos aquí descritos. QUINTO. Alcances de la cesión. Esta cesión es total, irrevocable, irrenunciable e imprescriptible. La presente cesión de invención y patente es eficaz para todos los demás países donde la Cesionaria pretenda registrar y explotar la patente. SEXTO: Actos Necesarios. LOS CEDENTES acuerdan realizar todos los actos, celebrar y entregar todos los documentos que sean razonablemente necesarios para el cumplimiento de las disposiciones del presente Acuerdo.	c) The Invention and Patent are free of lien, pledge, encumbrance, and license d) The Invention and the Patent do not infringe on the legal rights of any person or entity e) There are no pending law suits, nor will there ever be, regarding the Assignor's rights over the Invention and the Patent. f) This Agreement is valid and binding according to its terms and conditions, g) The Assignors are not subject to any other agreement, trial, or order opposed to the terms in this Agreement. h) The Assignors can register, grant, license, sell, exploit, reproduce, improve and in any form dispose of intellectual property of the invention and the patent on his behalf or by authorizing a third party, without any restriction. FOURTH. Agreement. This Agreement constitutes the full understanding of the Assignors with regards to the object in question, and guarantees the Assignee the exclusive right of use of the patent, in the terms mentioned hereto. FIFTH. Scope of the Agreement. This Assignment is total, irrevocable and inalienable. This Assignment Agreement is valid in all the countries where the Assignee will register and exploit the patent. SIXTH. Necessary Acts. The Assignors agree to fulfill any act, celebrate, and deliver all the documents that are reasonably necessary to comply with the terms and conditions established hereto. SEVENTH. Jurisdiction and Territoriality. The Assignors understand he is submitted to all of the legal systems of all countries where the assignee wants to protect the patent, its Legal and Administrative courts and other stipulations regarding patents, specifically this Agreement, and all of the situations stipulated hereto will
--	---

SEPTIMO. Jurisdicción y Territorialidad. LOS CEDENTES entienden que quedan sometidos al ordenamiento jurídico de todos los países donde la cesionaria deseen proteger la patente, a sus tribunales judiciales y administrativos y a las estipulaciones que en materia de patentes se dispongan en el derecho de propiedad intelectual y específicamente en este Acuerdo y todas las acciones del mismo se regirán e interpretarán conforme a la Ley de Patentes de cada país. <i>Leído lo escrito LOS CEDENTES, lo aceptan y declaran que entienden las consecuencias legales de cada una de las estipulaciones, por lo que Ebrahim Firoozabady firma en Richmond, California, Estados Unidos de América, a las 9:00 horas del 29 de julio del 2013, y el Thomas R Young firma en Miami, Florida, Estados Unidos de América, a las 10:00 horas del 29 de julio 2013.</i>  EBRAHIM FIROOZABADY  THOMAS YOUNG	be regulated and interpreted according to the Invention Patents, Drawings and Industrial Models and Utility Models Bill, N° 6867, and its Regulation. The Assignors declares they have read, understood and accepted the legal consequences of the above mentioned terms and conditions, and Ebrahim Firoozabady signs in Richmond, California, United States of America, at 9:00 hours on this 29th day of July, 2013, and Thomas R Young signs in Miami, Florida, United States of America at 10:00 hours on this 29th day of July, 2013.  EBRAHIM FIROOZABADY  THOMAS YOUNG
---	--

PA 1925314



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

July 18, 2013

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

APPLICATION NUMBER: *13/507,101*

FILING DATE: *June 04, 2012*

THE COUNTRY CODE AND NUMBER OF YOUR PRIORITY APPLICATION, TO BE USED FOR FILING ABROAD UNDER THE PARIS CONVENTION, IS *US13/507,101*

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

T. LAWRENCE
Certifying Officer



02480
U.S. PTO
060412

**PLANT
PATENT APPLICATION
TRANSMITTAL**

Attorney Docket No.	Del Monte Pineapple Rose
First Named Inventor	Shrahim Firoozabady
Title	Pineapple Plant named Rose
Express Mail Label No.	EI334280387US

(Only for new nonprovisional applications filed under 37 CFR 1.53(b))

ADDRESS TO:	Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	U.S. PTO 13/507101 06/04/2012
-------------	--	-------------------------------------

APPLICATION ELEMENTS See MPEP chapters 600 & 1600 concerning plant patent application contents.	ACCOMPANYING APPLICATION PARTS
---	--------------------------------

1. ☒ Fee Transmittal Form (e.g., PTO/SB/17) 2. ☒ Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27. 3. ☒ Specification (Total Pages 15) (preferred arrangement set forth below) - Descriptive title of the invention - Cross References to Related Applications - Statement Regarding Fed sponsored R & D - Latin name of genus and species - Variety denomination - Background of the Invention - Brief Description of the Drawings - Detailed Botanical Description - A single claim - Abstract of the Disclosure 4. ☐ Color drawing(s) (Total Sheets 13) (2 copies required - 37 CFR 1.165(b)) 5. Oath or Declaration (Total Pages) a. ☒ Newly executed (original or copy) b. ☐ A copy from a prior application (37 CFR 1.63(d)) (for continuation/divisional with Box 16 completed) i. ☐ DELETION OF INVENTOR(S) Signed statement attached deleting inventor(s) named in the prior application, see 37 CFR 1.63(d)(2) and 1.33(b). 6. ☒ Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76.	7. ☒ Assignment Papers (cover sheet & document(s)) 8. ☐ 37 CFR 3.73(b) Statement ☐ Power of Attorney (when there is an assignee) 9. ☐ English Translation Document (if applicable) 10. ☐ Information Disclosure Statement (IDS) PTO/SB/08 or PTO-1449 ☐ Copies of foreign patent documents, NPL & Pending U.S. patent applications 11. ☐ Preliminary Amendment 12. ☐ Return Receipt Postcard (MPEP 503) (Should be specifically itemized) 13. ☐ Certified Copy of Priority Document(s) (if foreign priority is claimed) 14. ☐ Request Nonpublication under 35 U.S.C. 122(b)(2)(B)(i) Applicant must attach form PTO/SB/35 or equivalent. 15. ☐ Other: Note: Please state the Latin name and variety denomination of the plant claimed in a separate section of the specification.
--	--

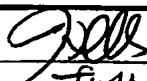
16. If a CONTINUING APPLICATION, check appropriate box, and supply the requisite information below and in the first sentence of the specification following the title, or in an Application Data Sheet under 37 CFR 1.76.

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: _____

Prior application information: Examiner _____ Art Unit: _____

17. CORRESPONDENCE ADDRESS

☒ The address associated with Customer Number: 27772		OR ☐ Correspondence address below	
Name			
Address			
City	State	Zip Code	
Country	Telephone	Email	

Signature		Date	06/04/2012
Name (Print/Typed)	John D. Dods	Registration No.	45,533

This collection of information is required by 37 CFR 1.53(b). The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

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

FEE TRANSMITTAL

Complete if known

Application Number	
Filing Date	
First Named Inventor	Ebrahim Firoozabady
Examiner Name	
Art Unit	
Practitioner Docket No.	

☒ Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27

TOTAL AMOUNT OF PAYMENT (\$)
415.00

METHOD OF PAYMENT (check all that apply)

☒ Check ☐ Credit Card ☐ Money Order ☐ None ☐ Other (please identify):

☐ Deposit Account Deposit Account Number: Deposit Account Name:

For the above-identified deposit account, the Director is hereby authorized to (check all that apply):

☐ Charge fee(s) indicated below ☐ Charge fee(s) indicated below, except for the filing fee

☐ Charge any additional fee(s) or underpayment of fee(s) under 37 CFR 1.16 and 1.17 ☐ Credit any overpayment of fee(s)

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

FEE CALCULATION

1. BASIC FILING, SEARCH, AND EXAMINATION FEES

Application Type	FILING FEES		SEARCH FEES		EXAMINATION FEES		Fees Paid (\$)
	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	
Utility	380	190	620	310	250	125	
Design	250	125	120	60	160	80	
Plant	250	125	380	190	200	100	415
Reissue	380	190	620	310	750	375	
Provisional	250	125	0	0	0	0	

2. EXCESS CLAIM FEES

Fee Description	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)
Each claim over 20 (including Reissues)	60	30
Each independent claim over 3 (including Reissues)	250	125
Multiple dependent claims	450	225
Total Claims		
-20 or HP =	Extra Claims x	Fee Paid (\$)
HP = highest number of total claims paid for, if greater than 20.		
Indep. Claims	Extra Claims	Fee Paid (\$)
-3 or HP =	Extra Claims x	Fee Paid (\$)
HP = highest number of independent claims paid for, if greater than 3.		

3. APPLICATION SIZE FEE

If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper (excluding electronically filed sequence or computer listings under 37 CFR 1.52(e)), the application size fee due is \$310 (\$155 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).

Total Sheets	Extra Sheets	Number of each additional 50 or fraction thereof	Fee (\$)	Fee Paid (\$)
- 100 =	/ 50 =	(round up to a whole number) x		

4. OTHER FEE(S)

	Fees Paid (\$)
Non-English specification, \$130 fee (no small entity discount)	
Non-electronic filing fee under 37 CFR 1.16(t) for a utility application, \$400 fee (\$200 small entity)	
Other (e.g., late filing surcharge):	

SUBMITTED BY

Signature		Registration No. (Attorney/Agent)	45,533	Telephone	202-463-3275
Name (Print/Type)	JOHN DADDIS	Date	06/04/2012		

This collection of information is required by 37 CFR 1.136. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 30 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

Title: Pineapple plant named 'Rosé' (EF2-114)

Description:

Species name: *Ananas comosus*.

Variety denomination: 'Rosé', with breeder name EF2-114.

BACKGROUND OF THE INVENTION

A new variety of pineapple (*Ananas comosus*), family Bromeliaceae, has been developed using genetic engineering techniques and named 'Rosé'. This process took 6 years; started in August 2005, using crown materials from variety MD2 (also known as Del Monte Gold pineapple), imported from Hawaii, to produce in vitro shoot cultures, introduce genes and DNA elements into leaf base sections, regenerate complete plants, perform field trials and select plants with internal pink- or red-colored fruits. The selected plants were asexually propagated in the field and via meristem culture to confirm the colored traits and other traits related to fruit and agronomic performance.

The plant is very similar to parental line, MD2, for plant and fruit characteristics and fruit internal quality. However, the internal flesh color in Rosé is pink or red, due to accumulation of lycopene in the edible part of fruit, the shell morphology is

referred as "Tiger" and it might be tolerant to natural occurrence of flowering. This new variety is best suited for the fresh market and residual fruit may be processed as juice or frozen product.

The main objective of this invention was to produce a unique and differentiated variety of pineapple by accumulation of high levels of carotenoids, in particular lycopene that produces red internal color while retaining most of the characteristics of the parental line, MD2.

The invention relates to carotenoid biosynthesis in pineapple plants. More specifically, this novel pineapple was produced by genetically transforming MD2 cells in tissue culture and regenerating complete plants (Scheme 1) with expression regulators that modulate lycopene biosynthesis in the internal section of the fruit. In addition plants were transformed with genes involved in ethylene biosynthesis pathway to control flowering in the plants.

Carotenoids are isoprenoid molecules that are widespread in nature and can occur as pigments in fruits, flowers, birds, and crustaceans. Animals are unable to synthesize carotenoids de novo, and rely upon the diet as a source of these compounds. Carotenoids may contribute fundamentally to human health and in recent years there has been considerable interest in dietary carotenoids with respect

to their potential in alleviating age-related diseases in humans. This attention has been mirrored by significant advances in cloning most of the carotenoid genes and in the genetic manipulation of crop plants with the intention of increasing levels in the diet.

In plants, carotenoids are essential components of the photosynthetic apparatus and are responsible for the red, orange, and yellow color of many flowers and fruit. Our understanding of carotenoid biosynthesis has advanced dramatically in recent years (Hirschberg, 2001 ; Fraser and Bramley, 2004). The pathway involves a series of desaturations, cyclizations, hydroxylations, and epoxidations commencing with the formulation of phytoene (See Fig. 1). A subsequent series of desaturations is responsible for lycopene synthesis. After the desaturation reactions, the cyclization of lycopene is catalyzed by two enzymes, the beta-cyclase and the zeta-cyclase, leading to the formation of beta-carotene (two beta-rings) and alpha-carotene (one beta-ring and one zeta-ring) (Cunnigham et al., 1996, 1998).

The genes of interest are derived from edible plant species, pineapple (*Ananas comosus*) or tangerine (*Citrus reticulata*). Specifically, we have over-expressed a tangerine phytoene synthase gene (Psy) (Ikoma et al, 2001). The gene is under transcriptional control of the pineapple bromelain inhibitor (BRI) gene. We have

also suppressed endogenous lycopene β -cyclase (b-Lyc) and/or lycopene ϵ -cyclase (e-Lyc) gene expression using RNA interference (RNAi) technology in order to increase accumulation of lycopene in edible tissues of pineapple fruit (Young, T. and Firoozabady, E. 2010, United States Patent 7,663,021). We constructed sense- and antisense-oriented sequences of the b-Lyc and e-Lyc genes derived from pineapple, which are separated by an intron of the light-inducible tissue-specific LS1 gene derived from potato (*Solanum tuberosum*) to form a hairpin structure. These genes are under transcriptional control of the Bromelain inhibitor gene promoter, which drives strong fruit-enhanced expression of the RNAi construct (Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005).

Flower initiation in pineapple can occur naturally primarily due to cool temperatures and short days. Natural flowering of pineapple plants is a major industry problem. To achieve the controlled flowering trait, we have altered expression of genes involved in ethylene biosynthesis. Ethylene is a plant hormone that plays an important role in every phase of plant development, including seed germination, fruit ripening, leaf and flower senescence, and abscission. In plants, ethylene is synthesized from the amino acid, Methionine (see Fig. 2). The immediate precursor of ethylene in higher plants is 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid (ACC) (Adams and Yang, 1979).

Ethylene is known to inhibit flowering in most plants. In mango and pineapple, ethylene promotes flowering (Salisbury and Ross, 1992). Ethylene, ethylene producing compounds and auxins have been used to induce flowering in commercial pineapple production (Turnbull et al., 1993).

We isolated a meristem-specific ACC synthase (fACCs) gene from pineapple and constructed sense- and antisense oriented sequences of the ACC synthase gene, which are separated by an intron of the light-inducible tissue-specific LS1 gene derived from potato (*Solanum tuberosum*) to form a hairpin structure for RNAi suppression of endogenous ACC synthase. The RNAi construct is under transcriptional control of the meristem-specific ACC promoter derived from pineapple.

Transformation method

Pineapple was transformed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of organogenic tissues using a method described by Firoozabady (US Patent No. 8049067). To achieve both high-carotenoid and controlled flowering phenotypes, *Agrobacterium* strains containing either a transformation plasmid for increased carotenoid biosynthesis or for decreased ethylene biosynthesis were co-cultivated with recipient pineapple tissues. Putative

17

transformed tissues were selected on media containing chlorsulfuron and subsequently screened for the presence of target genes by PCR.

A. tumefaciens, [Strain GV3101] (Koncz and Schell, 1986), is a disarmed Agrobacterium strain commonly used for the delivery of T-DNA into plant cells. Different genes were inserted into T-DNA in a binary vector (see Fig. 3) for introduction to pineapple. The Psy derived from *Citrus reticulata*, tangerine (Ikomaa et al, 2001), encodes an enzyme that converts geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) to cis-phytoene, an intermediate in lycopene and beta-carotene biosynthesis.

The lycopene beta-cyclase gene (b-Lyc) derived from *Ananas comosus*, pineapple, encodes an enzyme that converts lycopene to gamma-carotene, a metabolic precursor of beta-carotene.

The lycopene epsilon-cyclase gene (e-Lyc) derived from *Ananas comosus*, pineapple, encodes an enzyme that converts lycopene to sigma-carotene, a metabolic precursor of alpha-carotene.

The modified acetolactate synthase (Chaleff, R. S., and Mauvais, C. J., 1984)

(ALS) gene (surBHRA) derived from *Nicotiana tabacum*, tobacco, catalyzes the

biosynthesis of branched chain amino acids even in the presence of chlorsulfuron (Lee, K. et al., 1988), which allows for the selection of transformed pineapple cells.

Plasmid pHCW1 used for pineapple transformations was constructed by the laboratory of Del Monte Fresh Produce Company, Richmond, California. pHCW1 contains a tetracycline resistance gene (tetRA) from plasmid RP1 and the origin of replication from plasmid pACYC, which allows for selection and maintenance in *Escherichia coli* and the pVS1 replicon derived from *Pseudomonas aeruginosa*, which ensures replication in *Agrobacterium tumefaciens*. pHCW1 contains the 25-base pair sequences that delimit the T-DNA transfer and a 110-base pair synthetic sequence between the borders that forms multiple cloning restriction sites to allow integration of different T-DNA cassettes (see Table 1).

The plasmid pCHW1 was used to create pHCW.T-7 and pHCWflACC3'-2 binary vector plasmids. Binary vectors were transferred to disarmed *A. tumefaciens* strain GV3101. The GV3101 with pHCW.T-7 vector was named AG76 and the one with pHCWflACC3'-2 was named AG62 (see Fig 4). AG76 and AG62 were mixed together and used for pineapple transformation. Genetic elements of the vectors are described in Tables 2 and 3.

Genetic engineering of the MD2 took place in the Laboratory of Del Monte Fresh Produce Company in Richmond, California, USA, where transgenic plants were produced and propagated in tissue culture. Then the propaguls were taken to the research area of Corporacion de Desarrollo Agricola Del Monte, S.A. (Pindeco), Buenos Aires-Puntarenas, Costa Rica, for field evaluation, propagation in the field and in the laboratory for mass propagation of the variety.

SUMMARY OF THE INVENTION

A new variety of pineapple (*Ananas comosus*), family Bromeliaceae, has been developed using genetic engineering techniques and named 'Rosé' or EF2-114. Using crown materials from variety MD2 (also known as Del Monte Gold pineapple) to produce in vitro shoot cultures, introduce genes and DNA elements into leaf base sections, regenerate complete plants, perform field trials and select plants with internal pink- or red-colored fruits. The selected plants were asexually propagated in the field and via meristem culture to confirm the colored traits and other traits related to fruit and agronomic performance. The invention relates to production of a new and distinct variety of the Bromeliaceae, or pineapple family.

The new plant variety EF2-114 is characterized by pink or red flesh color and "Tiger" shell color, when compared with the parental line, MD2, and it might be tolerant to natural occurrence of flowering.

Internal color of fruits can be variable depending on the stage of ripening (Fig. 5).

The tiger trait was defined as the color in shell has in the shoulder of each fruitlet a combination of colors green, yellow, orange (and red) due to expression of carotenoid genes in the shell (Figs. 6-8). The plant morphology generally is the same as MD2, the parental plant (Figs. 9-12).

BOTANICAL DESCRIPTION OF THE PLANT

The description of the new variety is based on observations of well fertilized specimens which were grown under field conditions, in the Buenos Aires region, Costa Rica, where temperatures generally range from 14° C. to 37° C., and annual rainfall averages 3251 mm.

The plants were grown at a research facility in Buenos Aires-Puntarenas, Costa Rica.

All fruit and plant characteristics including color terminology and color designations reported herein are in accordance with Brazilian Descriptors for MD2 (Table 4). Essentially, "Rosé" is same as MD2 for all fruit and plant characteristics with the exception of fruit internal color, Tiger trait and possibly flowering control trait. See attached Brazilian Descriptors for MD2.

PLANT IDENTIFICATION:

- Name: *Ananas comosus*.
- Parentage: MD2.
- Origin: Genetic engineering of MD2 followed by selection in the field trials for the traits of interest.
- Botanic: Bromeliaceae or pineapple family. Subfamily: Bromelioideae.
Genus: *Ananas*. Subgenus: *comosus*. Variety: "Rosé", breeder's name EF2-114.
- Commercial: Bromeliad fruit plant.

General:

- Fertility.—As any other grown up pineapple, this plant is self-incompatible. For this reason, seeds are rarely observed. Commercial propagation is via vegetative propagules (suckers, stem shoots and slips) and fruit crowns.
- Vigor.—It is considered that the plant vigor is similar as to mother plants, MD2.
- Yield.— Estimated yield is same as MD2, 120-125 MT/ha in Plant Crop and 95-100 MT/ha in Ratoon Crop.

- **Market.**—Fruit will be designated to the international fruit market and commercialized into the fresh fruit market. Residual fruit may be processed as juice or frozen product.

What is claimed is:

1. A new and distinct variety of *Ananas comosus* plant named 'Rosé' with breeder name EF2-114 as shown and described herein.

Abstract:

A new pineapple variety named 'Rosé' is provided. Internal red or pink color with unique shell morphology and possibility of flowering control trait are traits of the new variety.

Table 1. Genetic Elements of plasmid pHCW1

Genetic Element	Source and Function
RB	A 25 bp nucleotide sequence that acts as the initial point of DNA transfer into plant cells which was originally isolated from pTiT37 (Depicker et al., 1982).
pVS1	The pVS1 replicon derived from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , which ensures replication in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al., 1984).
TetRA	A tetracycline resistance gene from plasmid RP1, which allows for selection of the binary plasmid in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> and <i>Escherichia coli</i> (Waters et al., 1983).
pACYC	The origin of replication from plasmid pACYC, which ensures replication in <i>Escherichia coli</i> (Chang et al., 1979).
LB	A 25-nucleotide sequence that delimits the T-DNA transfer and acts as the endpoint of DNA transfer into plant cells. It was originally isolated from TiA6 (Barker et al., 1983).
MCS	A 110-nucleotide sequence that synthetically was created, which is composing of multiple cloning restriction sites in order to allow integration of different cassettes into the plasmid.

Table 2. Genetic Elements of T-DNA in plasmid pHCW.T-7 in AG76

Genetic Element	Size (Kb)	Function (Reference)
BRIp2.5	2.5	A promoter derived from the bromelain inhibitor (BRI) gene from <i>Ananas comosus</i> that drives fruit-enhanced expression of the target gene(s).
Psy	1.131	A phytoene synthase (Psy) gene from <i>Citrus reticulata</i> , identical to the gene isolated from mandarin fruit (Ikoma et al. 2001), which encodes an enzyme in carotenoid biosynthesis.
Ubpter	0.94	A terminator derived from the polyadenylation sequence of the ubiquitin (Ubi) gene from <i>Ananas comosus</i> terminates transcription of the transgene(s).
BRIp2.5	2.5	A promoter derived from the promoter sequence from the bromelain inhibitor (BRI) gene from <i>Ananas comosus</i> that drives fruit-enhanced expression of the RNAi transgene.
eLyc sense fragment	0.504	A fragment of the lycopene ϵ -cyclase gene from <i>Ananas comosus</i> in sense orientation, which is used in an RNAi expression system to down-regulate endogenous lycopene ϵ -cyclase, an enzyme in carotenoid biosynthesis.
ST-LS1	0.193	An intron of the light-inducible tissue-specific ST-LS1 gene from <i>Solanum tuberosum</i> that functions as a spacer between sense and antisense gene fragments enhancing vector stability.
eLyc antisense fragment	0.504	A fragment of the lycopene ϵ -cyclase gene from <i>Ananas comosus</i> in antisense orientation, which is used in an RNAi expression system to down-regulate endogenous lycopene ϵ -cyclase, an enzyme in carotenoid biosynthesis.
Ubpter	0.94	A terminator derived from the polyadenylation sequence of the ubiquitin (Ubi) gene from <i>Ananas comosus</i> terminates transcription of the RNAi transgene.
BRIp2.5	2.5	A promoter derived from the promoter sequence from a bromelain inhibitor (BRI) gene from <i>Ananas comosus</i> that drives fruit-enhanced expression of the RNAi transgene.
b-Lyc sense fragment	0.619	A fragment of the lycopene β -cyclase gene from <i>Ananas comosus</i> in sense orientation, which is used in an RNAi expression system to down-regulated endogenous lycopene β -cyclase, an enzyme in carotenoid biosynthesis.

ST-LS1	0.193	An intron of the light-inducible tissue-specific ST-LS1 gene from <i>Solanum tuberosum</i> (Eckes et al, 1986) that functions as a spacer between sense and antisense gene fragments enhancing vector stability.
b-Lyc antisense fragment	0.619	A fragment of the lycopene β -cyclase gene from <i>Ananas comosus</i> in antisense orientation, which is used in an RNAi expression system to down-regulated endogenous lycopene β -cyclase, an enzyme in carotenoid biosynthesis.
Ubpter	0.94	A terminator derived from the polyadenylation sequence of the ubiquitin (Ubip) gene from <i>Ananas comosus</i> terminates transcription of the RNAi transgene.
Selectable Marker		
EHS1.7-Ubp1.5	4.257	A promoter derived from the epoxide hydrolase (EHS) gene fused to the ubiquitin (Ubip) gene promoter and the native intron from <i>Ananas comosus</i> that drives constitutive expression of the selectable marker gene.
EHS1.7	1.7	A promoter derived from the epoxide hydrolase (EHS) gene from <i>Ananas comosus</i> (Neuteboom et al, 2002) that drives constitutive expression of the selectable marker gene.
Ubp1.5	1.5 + 1.057	A 1.5 kb tetrameric ubiquitin gene promoter from pineapple (<i>Ananas comosus</i>), which drives constitutive expression of the selectable marker gene. The promoter includes an endogenous 1057 bp intron sequence.
ALS	1.17	A mutant acetolactate synthase gene from tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>), which confers resistance to chlorsulfuron and allows selection of transformed plant cells (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).
ALS 3'	2.7	An endogenous terminator derived from untranslated polyadenylation signal of the acetolactate synthase (ALS) gene from <i>Nicotiana tabacum</i> (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).

Table 3. Genetic Elements of T-DNA in plasmid pHCWflACC3'-2 in AG62. Elements are the same as above (Table 2) except those mentioned below.

Genetic Element	Size (Kb)	Function (Reference)
flACS(+) sense	0.406	A 406 bp 3' sequence of meristem-specific ACC synthase gene, isolated from pineapple (<i>A. comosus</i>), in the sense orientation, which is used in an RNAi expression system to down-regulate endogenous ACC synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis, thereby producing a plant that displays improved characteristics such as delayed flowering.
flACS(-) antisense	0.406	A 406 bp 3' sequence of meristem-specific ACC synthase gene, isolated from pineapple (<i>A. comosus</i>), in the antisense orientation.

Scheme 1: production of EF2-114 pineapples.



Stage	Date (time)
Immature MD2 fruits (40 days prior to harvest) arrived from Hawaii	8/10/2005
Meristems isolated from the crown and cultured	8/17/2005
Established shoot culture and propagate <i>in vitro</i>	8/17/2005 to 9/20/2006
Longitudinal sections of shoots were prepared and cultured	9/20/2006 to 9/29/2009
Leaf base sections were prepared and mixed with <i>Agrobacterium</i> strains AG-62 and AG-76 and cocultivated for three days	9/29/2006 to 10/02/2006
Leaf bases were transferred to recovery media containing carbenicillin (to kill off <i>Agrobacterium</i>)	10/2/2006 to 10/27/2006
Leaf bases were transferred to selection media containing antibiotics (to kill off residual <i>Agrobacterium</i>) and chlorsulfuron, CS (an herbicide), to select for transformed plant cells and produce transformed organogenic materials. A total of 7 transfers were done with increasing selection pressure to produce pure transgenic tiny buds.	10/27/2006, 11/2/2006, 11/14/2006, 12/4/2006, 1/3/2007, 1/29/2007, 2/15/2007
Tiny bud clusters were transferred (two times) to media containing CS and antibiotics to further grow and multiply transformed shoots and shoot buds	3/13/2007, 3/29/2007
Shoots and shoot buds were transferred to media containing high level of Agar (8 and 10 g/l) to normalize transformed shoots and shoot buds	4/10/2007
Shoot clusters were transferred to media with CS, antibiotics, Agar (7-10) and hormones to normalize and propagate shoots.	5/4/2007 to 12/14/2007
An event referred to as 16.184.1 included 14 lines were subcultured in liquid media for further growth	1/21/2008
9 lines or groups of the 16.184.1 event (consisting of 349 shoots) were shipped to Pindeco for field	2/14/2008

trials. In Pindeco the 9 groups were numbered as 109 – 117 and were grown in the greenhouse for further growth and filed trials.	
2 additional lines or groups of the 16.184.1 event (consisting of 85 shoots) were shipped to Pindeco for field trials. In Pindeco the 2 groups were numbered as 208 and 209 and were grown in the greenhouse for further growth and filed trials.	8/1/2008
PCR analyses confirmed that the genes are present in tissue culture-derived event shoot samples	8/26/2008
2 additional lines or groups of the 16.184.1 event (consisting of 150 shoots) were shipped to Pindeco for field trials. In Pindeco the 2 groups were numbered as 345 and 346, and were grown in the greenhouse for further growth and filed trials.	1/26/2009
Plants were grown in the GH for 15-20 weeks before transferred to soil in the field trials. Fruits were cut for internal color evaluation. During the field trials groups 109, 110, 114, 116, 208, and 346 exhibited pink or red internal colors. Internal quality (Brix, citric acid, ascorbic acid and pH) were measured on the colored fruits and propaguls were grown for future generations' evaluation. Molecular analyses (PCR and Southern) confirmed the presence of the genes. Southern further confirmed that all these group are one transgenic even and collectively are referred as EF2-114	2009-2012

Table 4. MINIMUM DESCRIPTORS FOR PINEAPPLE (*Ananas comosus* (L.) Merrill)

Proposed name for the plant variety MD-2

(+) See item "VI. OBSERVATIONS AND FIGURES".

Characteristic	Description of the characteristic	Code for each description MD-2
1. Plant: attitude (+)	<i>semi-erect</i> <i>intermediary</i> <i>open</i>	<u>7</u>
2. Plant: number of active leaves (+)	<i>low</i> <i>medium</i> <i>high</i>	<u>5</u>
3. Leaf: length (+)	<i>short</i> <i>medium</i> <i>long</i>	<u>5</u>
4. Leaf: width (+)	<i>narrow</i> <i>medium</i> <i>broad</i>	<u>5</u>
5. Leaf predominant color on upper face	<i>light green</i> <i>dark green</i> <i>purple-green</i> <i>green-purple</i> <i>purple</i> <i>vred</i>	<u>2</u>
6. Leaf: anthocyanin coloration	<i>absent</i> <i>present</i>	<u>1</u>
7. Leaf: variegation	<i>absent</i> <i>present</i>	<u>1</u>
8. Leaf: spines (+)	<i>absent</i> <i>inconspicuos</i> <i>conspicuos</i>	<u>2</u>
9. Leaf: distribution of spines at margin (+)	<i>at base only</i> <i>at apex only</i> <i>at base and apex</i> <i>regular</i> <i>irregular</i>	<u>2</u>
10. Inflorescence: number of flowers (+)	<i>low</i> <i>medium</i> <i>high</i>	<u>5</u>

11. Flower: predominant coloration of sepal	whitish greenish purplish	<u>3</u>
12. Flower: petals base	free fused	<u>1</u>
13. Flower: <i>imbricate</i> petals	absent present	<u>2</u>
14. Flower: predominant coloration of petal tip	whitish light purple medium purple dark purple	<u>5</u>
15. Flower: ratio of white color at petal (+)	low medium high	<u>3</u>
16. Flower: disposition of anthers	separate grouped	<u>2</u>
17. Flower: number of pollen at the anthers	low medium high	<u>3</u>
18. Flower: length of style (+)	short medium long	<u>2</u>
19. Suckers: number (+)	low medium high	<u>5</u>
20. Peduncle: length (+)	short medium long	<u>3</u>
21. Peduncle: diameter at the middle portion (+)	small medium large	<u>5</u>
22. Peduncle: number of <i>younglets/bulbs/slips</i> (+)	(absent or very low) (low) (medium) (high) (very high)	<u>3</u>
23. Peduncle: number of bracts	low medium high	<u>5</u>
24. Peduncle: <i>imbricate</i> bracts	absent present	<u>2</u>
25. Peduncle: trichomes	absent present	<u>2</u>

26. Fruit: length (+)	<i>short</i> <i>medium</i> <i>long</i>	<u>5</u>
27. Fruit: diameter at base (+)	<i>small</i> <i>medium</i> <i>large</i>	<u>7</u>
28. Fruit: diameter at the middle portion	<i>small</i> <i>medium</i> <i>large</i>	<u>7</u>
29. Fruit: diameter of tip (+)	<i>small</i> <i>medium</i> <i>large</i>	<u>7</u>
30. Fruit: shape (+)	<i>conic</i> <i>conic to cylindric</i> <i>cylindric</i> <i>eliptic</i> <i>global/spheric</i>	<u>3</u>
31. Fruit: color before physiologic maturity, with the fruit completely shaped	<i>silvery green</i> <i>light green</i> <i>medium green</i> <i>dark green</i> <i>red</i> <i>r purple</i>	<u>4</u>
32. Fruit: color of skin at the point to consume	(<i>green</i>) (<i>green with yellow spots</i>) (<i>light yellow</i>) (<i>golden yellow</i>) (<i>redish orange</i>) (<i>purple</i>)	<u>4</u>
33. Fruit: color homogeneity of the skin	<i>absent</i> <i>present</i>	<u>2</u>
34. Fruit: number of fruit basal slips (+)	(<i>absent or very low</i>) (<i>low</i>) (<i>medium</i>) (<i>high</i>) (<i>very high</i>)	<u>1</u>
35. Fruit: detachable fruitlets	<i>absent</i> <i>present</i>	<u>1</u>
36. Fruit: relief of fruitlet	<i>flat</i> <i>prominent</i> <i>very prominent</i>	<u>1</u>

37. Fruit: color of flesh	white to cream yellow golden yellow orange	<u>3</u>
38. Fruit: firmness of flesh	soft medium firm	<u>7</u>
39. Fruit: <u>fibrousness</u> in the flesh	low medium high	<u>5</u>
40. Fruit: succulence	low medium high	<u>5</u>
41. Fruit: diameter of central axis (+)	small medium large	<u>7</u>
42. Fruit: concentration of soluble solids (Brix degrees) (+)	low medium high	<u>5</u>
43. Fruit: acidity (fixed in percentage) (+)	low medium high	<u>5</u>
44. Fruit: flavor	weak medium strong	<u>5</u>
45. Crown: position	erect open <u>decumbent</u>	<u>3</u>
46. Crown: length (+)	short medium long	<u>5</u>
47. Crown: weight (+)	low medium high	<u>7</u>
48. Crown: tendency to multiple crowns	(absent or very low) (low) (medium) (high) (very high)	<u>3</u>

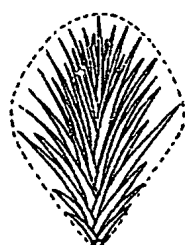
COMPLEMENTARY CHARACTERISTIC

49. Resistance to fusarium (high resistance)
 (*Fusarium subglutinans*) (resistant)
 (medium resistance)
 (medium susceptibility)
 (susceptible)
 (high susceptibility)

4

VI.

OBSERVATIONS AND FIGURES

Characteristic 1. Plant: attitude

3
semi-erect



5
intermediary



7
open

Characteristic 2. Plant: number of active leaves

- (low) < 40
- (medium) 40 – 60
- (high) > 60

Characteristic 3. Leaf: length

(short) < 90 cm

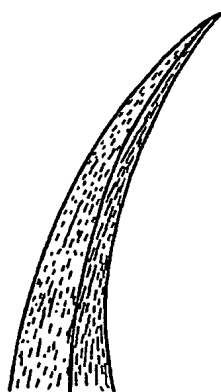
- (*medium*) 90 – 120 cm
- (*long*) > 120 cm

Characteristic 4. Leaf: width

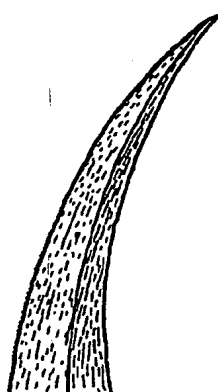
- (*narrow*) < 6,0 cm
- (*medium*) – 6,0 a 7,0 cm
- (*broad*) > 7,0 cm

Characteristic 8. Leaf: spines and 9. Leaf: distribution of spines at margin

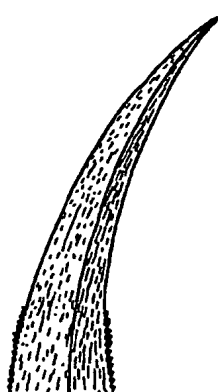
Inconspicuous" are microscopic spines, which can be detected through the sense of touch. When we touch our hands at the margins of leaves, we feel that it's like a sandpaper.) Conspicuous" are spines, which are visible with the naked eye.)



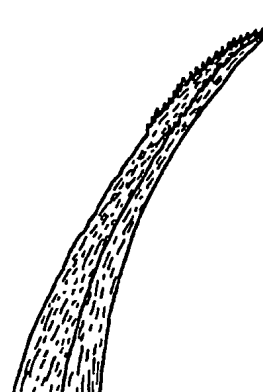
absents



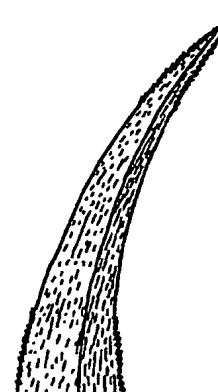
inconspicuous
?



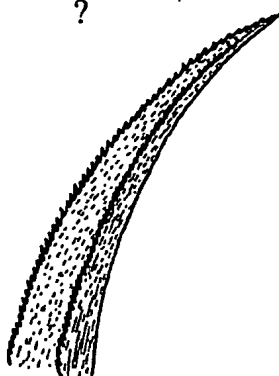
at base



(at apex)



at base and apex



regular



irregular

Characteristic 10. Inflorescence: number of flowers

(low) < 130

(medium) 130 - 170

(high) > 170

Characteristic 15. Flower: ratio of the white color in the petal

(low) < 30 %

(medium) 30 - 60 %

(high) > 60 %

Characteristic 18. Flower: length of style

Short: shorter than the stamens

Medium: with the same length of the stamens

Long: longer than the stamens

Characteristic 19. Suckers: number

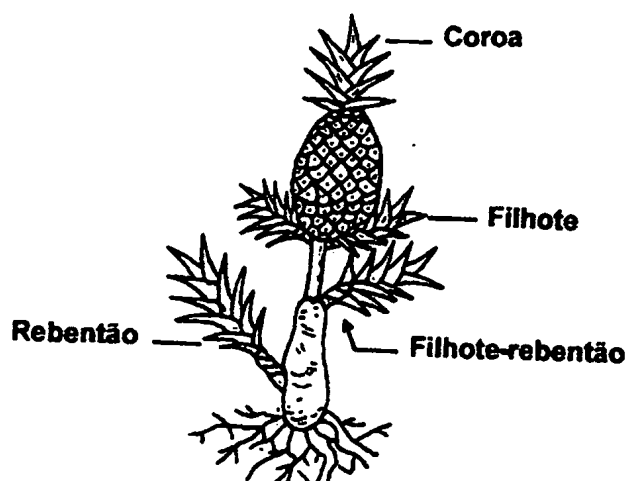
- (*low*) < 1
- (*medium*) 1 - 2
- (*high*) > 2

Characteristic 20 . Peduncle: length

- (*short*) < 18 cm
- (*medium*) 18 – 28 cm
- (*long*) > 28 cm

Characteristic 21. Peduncle: diameter at the middle portion

- (*small*) < 2,5 cm
- (*medium*) 2,5 – 3,5 cm
- (*large*) > 3,5 cm

Characteristic 22. Peduncle: number of slips

- (*low*) < 5
- (*medium*) 5 – 10
- (*high*) > 10

Characteristic 26. Fruit: length. Measured from base to top without consider the crown

- (*short*) < 15 cm
- (*medium*) 15 – 20 cm
- (*long*) > 20 cm

Characteristic 27. Fruit: diameter of base

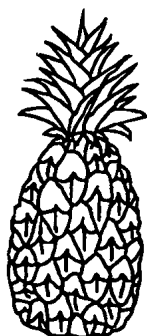
- (*small*) < 10 cm
- (*medium*) 10 – 12 cm
- (*large*) > 12 cm

Characteristic 29. Fruit: diameter of tip

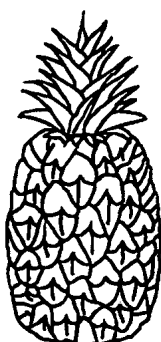
- (*small*) < 6 cm
- (*medium*) 6 - 10 cm
- (*large*) > 10 cm

Characteristic 30. Fruit: shape

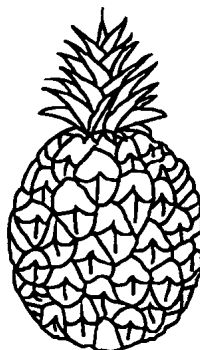
1
conic



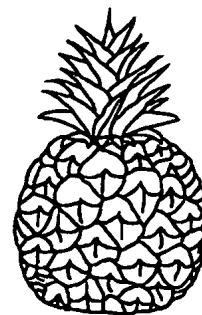
2
conic to cylindric



3
cylindric



4
eliptic



5
global

Characteristic 34. Fruit: number of fruit basal slips

- (*low*) < 1
- (*medium*) 1 - 2
- (*high*) > 2

Characteristic 41. Fruit: diameter of central axis

- (*small*) < 1,5 cm
- (*medium*) 1,5 - 2,5 cm
- (*large*) > 2,5 cm

Characteristic 42. Fruit: concentration of soluble solids (Brix degrees)

- (*low*) < 13
- (*medium*) 13 - 16
- (*high*) > 16

Characteristic 43. Fruit: acidity (fixed in percentage)

- (*low*) < 0,5
- (*medium*) 0,5 - 0,7
- (*high*) > 0,7

Characteristic 46. Crown: length

- (short) < 15 cm
- (medium) 15 – 20 cm
- (long) > 20 cm

Characteristic 47. Crown: weight

- (low) < 100 g
- (medium) 100 – 130 g
- (high) > 130 g

REFERENCES:

1. Adams DO, Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;76(1):170-174.
2. Barker, R., Idler, K., Thompson, D., Kemp, J. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2:335-350.
3. Chaleff, R. S., and Mauvais, C. J. (1984) Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224:1443-1445.
4. Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15a cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156
5. Cunningham, F.X., Pogson, B.J., Sun, Z., McDonald, K., DellaPenna, D., and Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613-1626.
6. Cunningham, F.X., Jr., and Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557-583.
7. DePicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H. M. (1983) Nucleotide sequences and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-511.
8. Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L., (1986) Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots, *Mol. Gen. Genet.* 205, 14-22

9. Firoozabady, E. US Patent No. 8049067, Organogenic transformation and regeneration.
10. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-65
11. Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 210-218.
12. Hirschberg, I, M. Cohen, M. Harker, T. Lota, V Mann, and I. Pecker. 1997. Molecular genetics of carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 69:2145-2150.
13. Ikomaa, Yoshinori, Akira Komatsub, Masayuki Kitac, Kazunori Ogawad, Mitsuo Omurac, Masamichi Yanoc and Takaya Moriguchi, (2001) Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 111: 232-238.
14. Itoh, Y., Watson, J.M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220.
15. Koncz C, and Schell J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396
16. Lee, K. et al., (1988) The molecular basis for sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
17. Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D, Christopher DA, 2002. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science*, 165:1021-1035.
18. Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*, 4th ed., Wadsworth.

19. Turnbull, C.G.N.; Nissen, R.J.; Sinclair, E.R.; Anderson, K.L.; Shorter, A.J. Ethephon and causes of flowering failure in pineapple. *Acta Horticulturae*, Honolulu, n.334, p. 83-88, out, 1993.
20. Young, T. and Firoozabady, E. 2010, United States Patent 7,663,021. Transgenic pineapple plants with modified carotenoid levels and methods of their production
21. Waters, S. H., Rogowski, P., Ginsted, J., Altenbuchner, J., and Schmidt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721; nucleotide sequence analysis. *Nuc. Acids Res.* 11(17):6089-6105.
22. Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005, patent PUBLICATION NUMBER-2006113709/WO-A2 Plant promoters, terminators, genes, vectors and related transformed plants.

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

**PLANT PATENT
APPLICATION (35 U.S.C. 161)
DECLARATION
(37 CFR 1.63)**

☒ Declaration Submitted with Initial Filing **OR** ☐ Declaration Submitted after Initial Filing (surcharge (37 CFR 1.16(e)) required)

Attorney Docket Number

First Named Inventor

COMPLETE IF KNOWN

Application Number

Filing Date

Art Unit

Examiner Name

I hereby declare that:

Each inventor's residence, mailing address, and citizenship are as stated below next to their name.

I believe the inventor(s) name below to be the original and first inventor(s) of the new and distinct variety of:

Ebrahim Firoozabady, 3009 Shetland Dr., Pleasant Hill, CA 94523, US Citizen.

plant named: **'Rosé' (EF2-114)**

which is claimed and for which a plant patent is sought, the application of which

☐ is attached hereto **OR** ☐ was filed on (MM/DD/YYYY) as United States

Application Number and was amended on (MM/DD/YYYY) (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified application, including the claim, as amended by any amendment specifically referred to above.

I have asexually reproduced the plant to which this application applies.

☐ Said plant was found in cultivated area (check this box for newly found plant only)

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the National or PCT International filing date of the continuation-in-part.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. 119(a)-(d) or (f), or 365(b) of any foreign application(s) for patent, inventor's or plant breeder's rights certificate(s), or 365(a) of any PCT international application which designated at least one country other than the United States of America, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent, inventor's or plant breeder's rights certificate(s), or any PCT international application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application Number(s)	Country	Foreign Filing Date (MM/DD/YYYY)	Check Only If Priority Not Claimed	Certified Copy Attached?	
				YES	NO
			☐	☐	☐
			☐	☐	☐
			☐	☐	☐
			☐	☐	☐

☐ Additional foreign application numbers are listed on a supplemental priority data sheet PTO/SB/02B attached hereto.

(Page 1 of 2)

This collection of information is required by 35 U.S.C. 115 and 37 CFR 1.63. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 21 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

44

DECLARATION (37 CFR 1.63) FOR PLANT APPLICATION USING AN APPLICATION
DATA SHEET (37 CFR 1.76)

Title of Invention Pineapple plant named 'Rosé' (EF2-114)

As the below named inventor(s), I/we declare that:

This declaration is directed to:

☒ The attached application, or

☐ Application No. _____ filed on _____

☐ as amended on _____ (if application);

I/we believe that I/we am/ are the original and first inventor(s) of the new and distinct variety of plant which is claimed and for which a plant patent is sought;

I/we have asexually reproduced the plant to which this application applies;

☐ The plant was found in a cultivated area (check this box for a newly found plant only);

I/we have reviewed and understand the contents of the above-identified application, including the claims, as amended by any amendment specifically referred to above;

I/we acknowledge the duty to disclosure to the United State Patent and Trademark Office all information known to me/us to be material to patentability as defined in 37 CFR 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of the continuation-in-part.

WARNING:

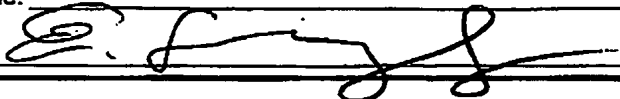
Petitioner/applicant is cautioned to avoid submitting personal information in documents filed in a patent application that may contribute to identity theft. Personal information such as social security numbers, bank account numbers, or credit card numbers (other than a check or credit card authorization form PTO-2038 submitted for payment purposes) is never required by the USPTO to support a petition or an application. If this type of personal information is included in documents submitted to the USPTO, petitioners/applicants should consider redacting such personal information from the documents before submitting them to the USPTO. Petitioner/applicant is advised that the record of a patent application is available to the public after publication of the application (unless a non-publication request in compliance with 37 CFR 1.213(a) is made in the application) or issuance of a patent. Furthermore, the record from an abandoned application may also be available to the public if the application is referenced in a published application or an issued patent (see 37 CFR 1.14). Checks and credit card authorization forms PTO-2038 submitted for payment purposes are not retained in the application file and therefore are not publicly available.

All statements made herein of my/our own knowledge are true, all statements made herein on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 U.S.C. 1001, and may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

FULL NAME OF INVENTOR(S)

Inventor one: Ebrahim Firoozabady

Date: 6/4/12

Signature: 

Citizen of: USA

☒ Additional inventors or a legal representative are being named on _____ additional form(s) attached hereto.

This collection of information is required by 37 U.S.C. 115 and 37 CFR 1.63. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 1 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

45

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

DECLARATION - Plant Patent Application

Direct all correspondence to: ☐ The address associated with Customer Number:
OR ☐ Correspondence address below

Name

Address

Address

City

State

ZIP

Country

Telephone

Email

WARNING:

Petitioner/applicant is cautioned to avoid submitting personal information in documents filed in a patent application that may contribute to identity theft. Personal information such as social security numbers, bank account numbers, or credit card numbers (other than a check or credit card authorization form PTO-2038 submitted for payment purposes) is never required by the USPTO to support a petition or an application. If this type of personal information is included in documents submitted to the USPTO, petitioners/applicants should consider redacting such personal information from the documents before submitting them to the USPTO. Petitioner/applicant is advised that the record of a patent application is available to the public after publication of the application (unless a non-publication request in compliance with 37 CFR 1.213(a) is made in the application) or issuance of a patent. Furthermore, the record from an abandoned application may also be available to the public if the application is referenced in a published application or an issued patent (see 37 CFR 1.14). Checks and credit card authorization forms PTO-2038 submitted for payment purposes are not retained in the application file and therefore are not publicly available.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 U.S.C. 1001 and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

NAME OF SOLE OR FIRST INVENTOR:

☐

A petition has been filed for this unsigned inventor

Given Name

Ebrahim

Family Name or Surname

Firoozabady

Inventor's Signature



Date

6/4/12

Residence: City

Pleasant Hill

State

CA

Country

USA

Citizenship

US Citizen

Mailing Address

3009 Shetland Dr

Mailing Address

City

Pleasant Hill

State

CA

Zip

94523

Country

USA

☒ Additional inventors or legal representative(s) are being named on the _____ supplemental sheet(s) PTO/SB/02A or 02LR attached hereto.

DECLARATION (37 CFR 1.63) FOR PLANT APPLICATION USING AN APPLICATION
DATA SHEET (37 CFR 1.76)

Title of Invention	PINEAPPLE PLANT NAMED ROSÉ (E2-114)
As the below named inventor(s), I/we declare that: This declaration is directed to: ☒ The attached application, or ☐ Application No. _____ filed on _____ ☐ as amended on _____ (if application);	
I/we believe that I/we am/ are the original and first inventor(s) of the new and distinct variety of plant which is claimed and for which a plant patent is sought; I/we have asexually reproduced the plant to which this application applies; ☐ The plant was found in a cultivated area (check this box for a newly found plant only);	
I/we have reviewed and understand the contents of the above-identified application, including the claims, as amended by any amendment specifically referred to above; I/we acknowledge the duty to disclosure to the United State Patent and Trademark Office all information known to me/us to be material to patentability as defined in 37 CFR 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of the continuation-in-part.	
WARNING: Petitioner/applicant is cautioned to avoid submitting personal information in documents filed in a patent application that may contribute to identity theft. Personal information such as social security numbers, bank account numbers, or credit card numbers (other than a check or credit card authorization form PTO-2038 submitted for payment purposes) is never required by the USPTO to support a petition or an application. If this type of personal information is included in documents submitted to the USPTO, petitioners/applicants should consider redacting such personal information from the documents before submitting them to the USPTO. Petitioner/applicant is advised that the record of a patent application is available to the public after publication of the application (unless a non-publication request in compliance with 37 CFR 1.213(a) is made in the application) or issuance of a patent. Furthermore, the record from an abandoned application may also be available to the public if the application is referenced in a published application or an issued patent (see 37 CFR 1.14). Checks and credit card authorization forms PTO-2038 submitted for payment purposes are not retained in the application file and therefore are not publicly available.	
All statements made herein of my/our own knowledge are true, all statements made herein on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 U.S.C. 1001, and may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.	
FULL NAME OF INVENTOR(S) Inventor ^{two:} <u>Thomas R Young</u> Date: <u>4 June 2011</u> Signature: <u>TLR Y</u> Citizen of: <u>USA</u>	
☒ Additional inventors or a legal representative are being named on _____ additional form(s) attached hereto.	

This collection of information is required by 37 U.S.C. 115 and 37 CFR 1.63. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 1 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.
If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

Fig. 1. Enzymes and genes in the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. (Adapted from J. Hirschberg et al., Pure & Appl. Chem. 69(10):2151-58). Genes used in pineapple transformations to create EF2-114 are highlighted.

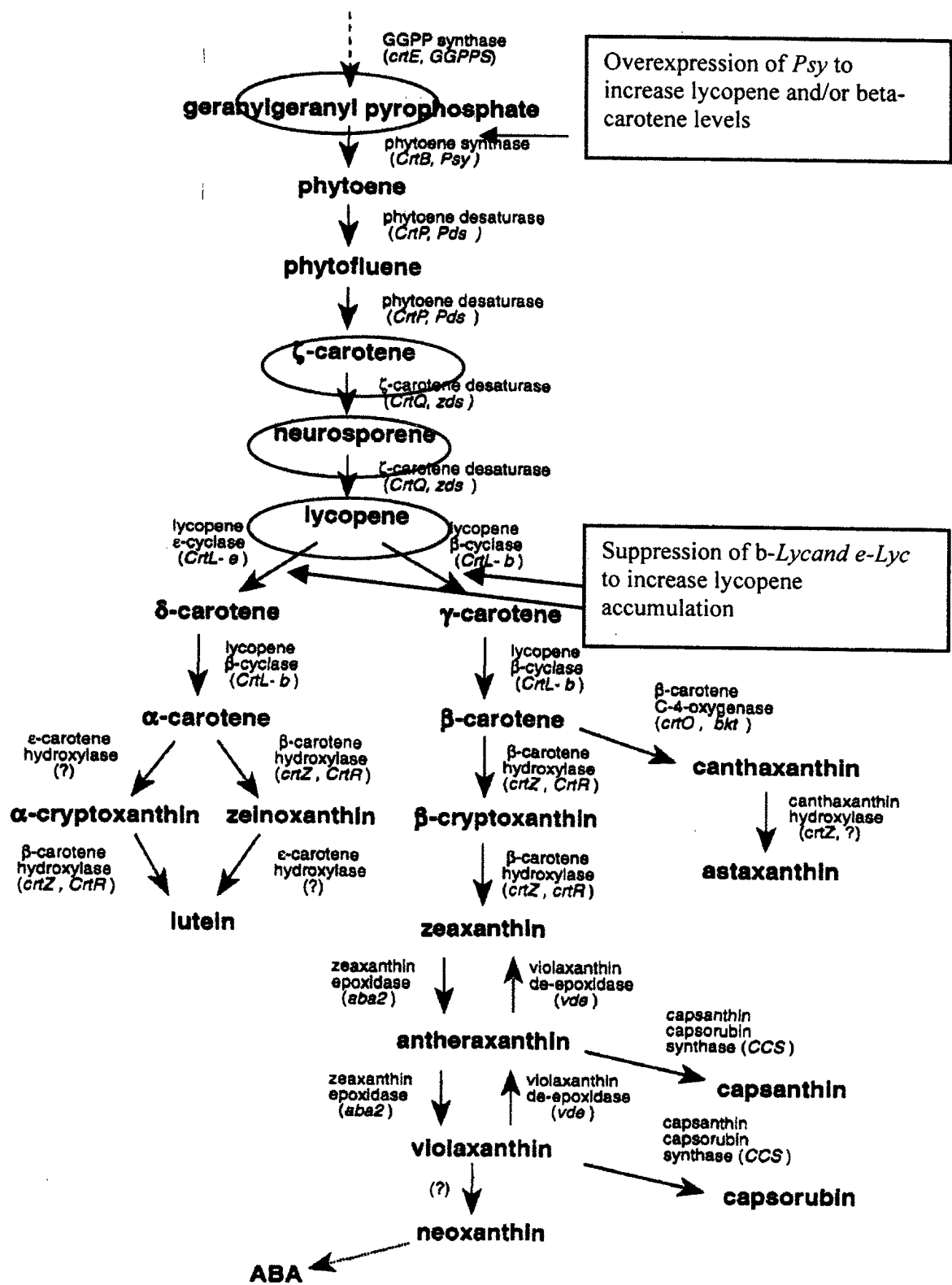


Fig. 2 – Ethylene biosynthesis pathway in plants

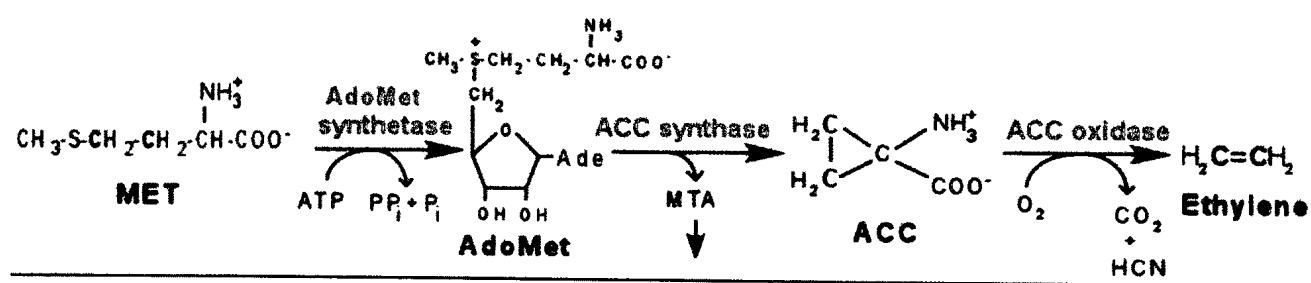


Fig. 3. Map of plasmid binary vector, pHCW1, used for genetic engineering of pineapple.

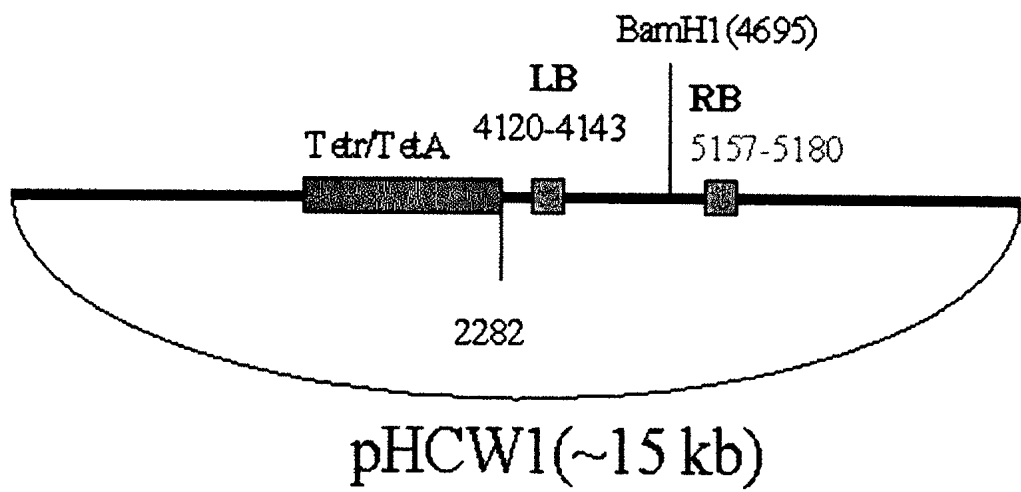
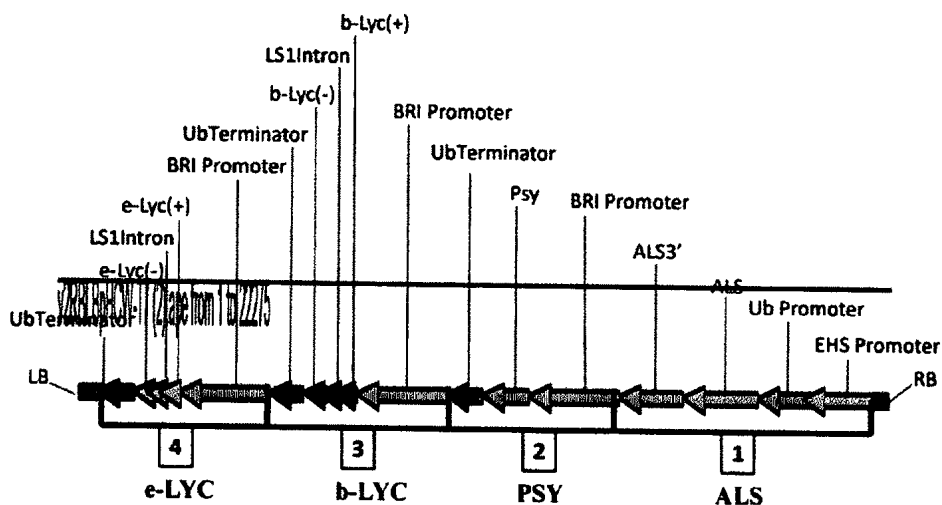


Fig. 4. T-DNA in plasmid pHCW1 backbone to create pHCW.T-7 binary vector (in AG76) and pHCWflACC3'-2 binary vector (in AG62).

Schematic Diagram of T-DNA Region of AG76



Schematic Diagram of T-DNA Region of AG62

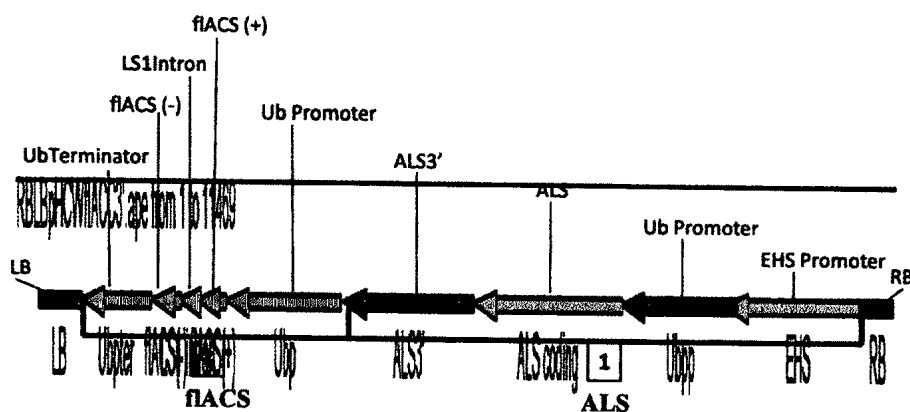
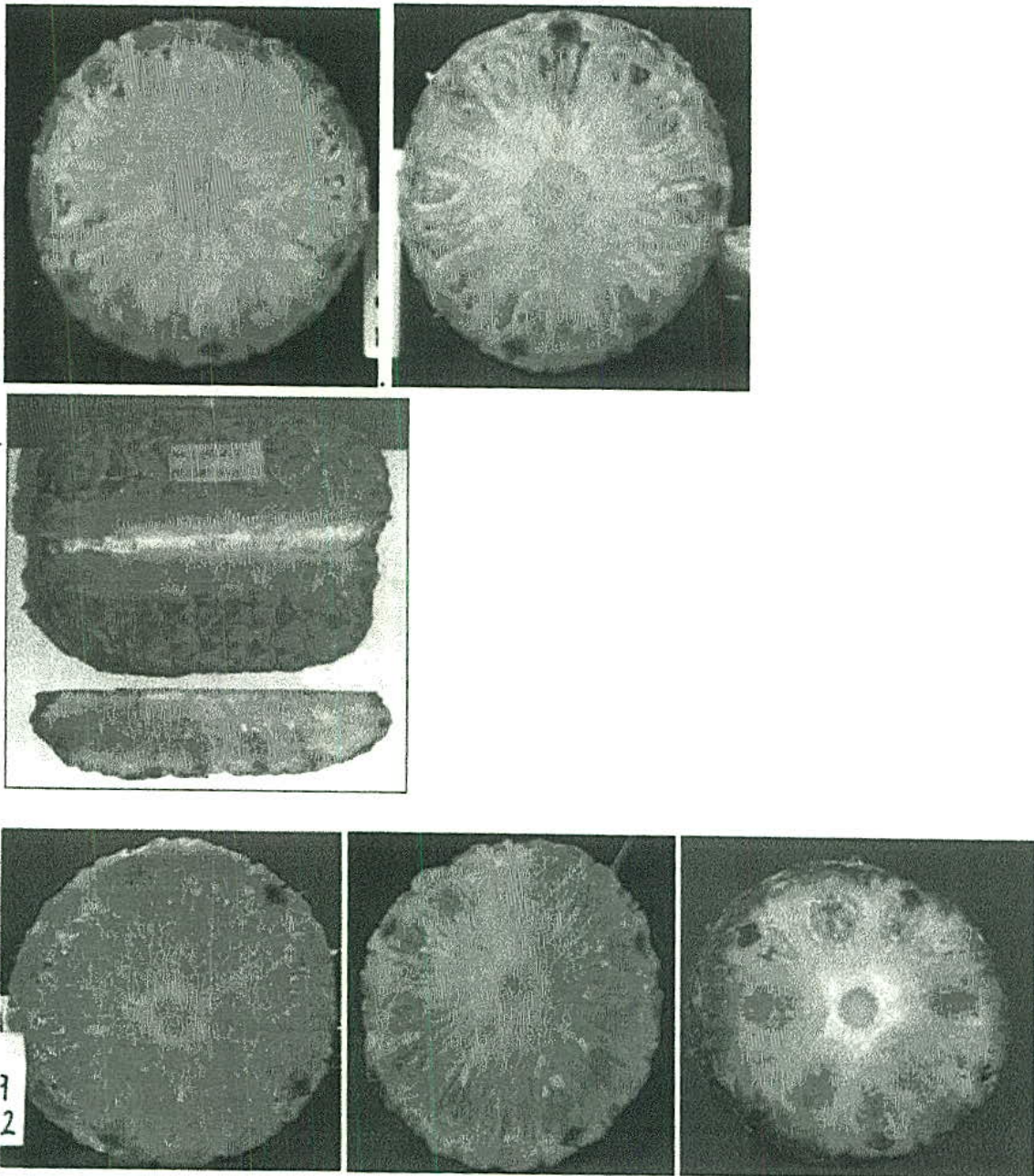


Fig. 5. Shows the internal color of the fruits being pink to red due to accumulation of lycopene.



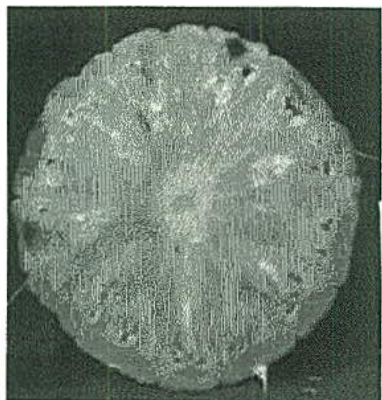
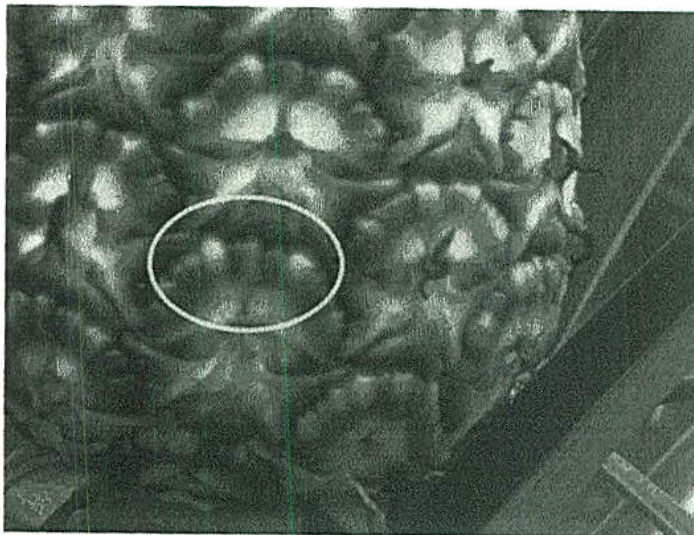


Fig. 6. Shows "Tiger" shell color in EF2-114 fruits. The color in shell has in the shoulder of each fruitlet a combination of colors green, yellow, orange



(and red).

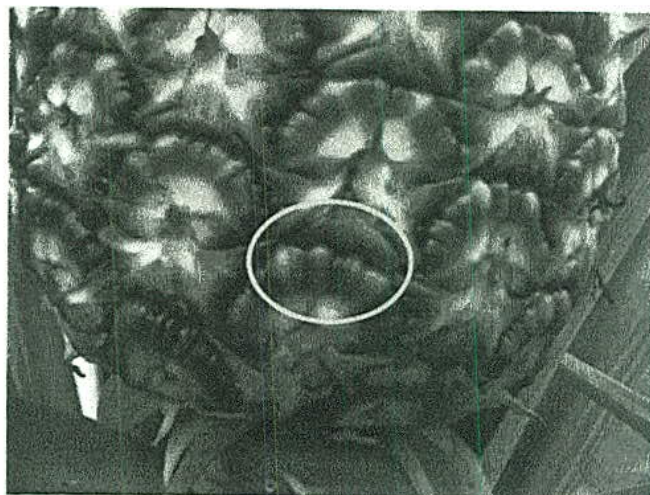


Fig. 7. A "Tiger" fruit showing shell and internal color at harvest.

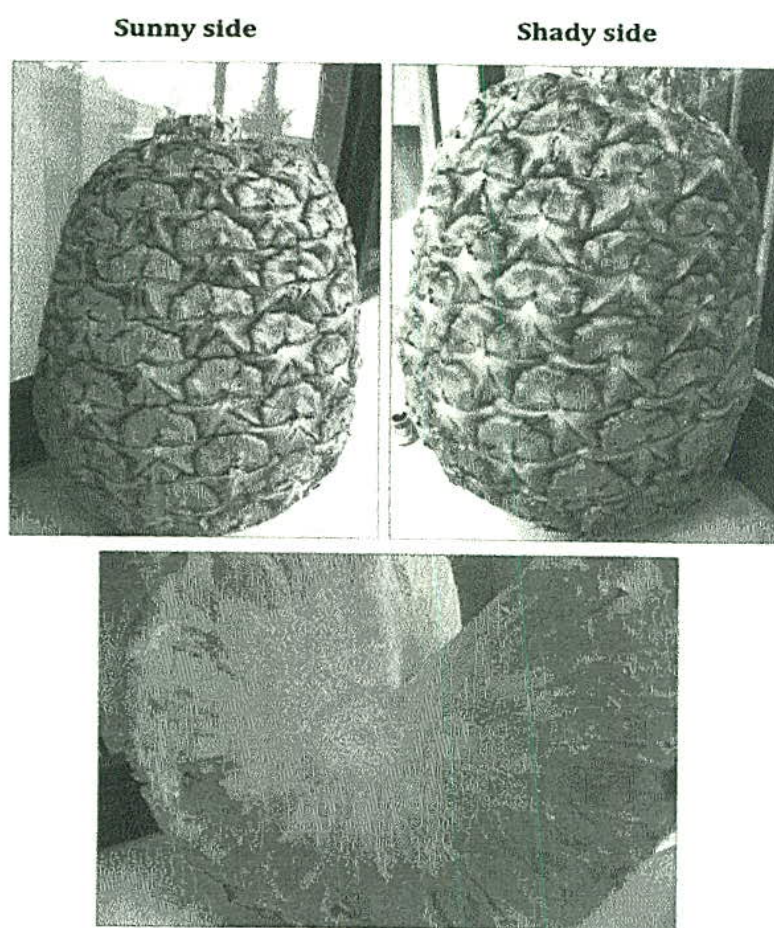


Fig 8. Shows an immature fruit of 'Rosé' with Tiger shell morphology (left) and an immature fruit of MD2 (right) both ~145 days after forcing.



Fig. 9. Shows overhead view of 'Rosé' EF2-114 plant.

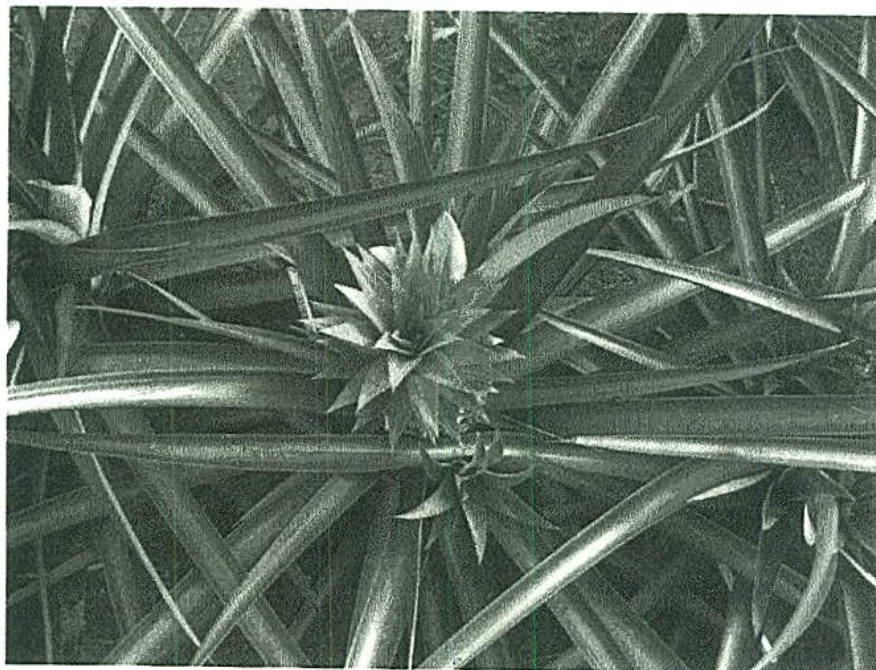


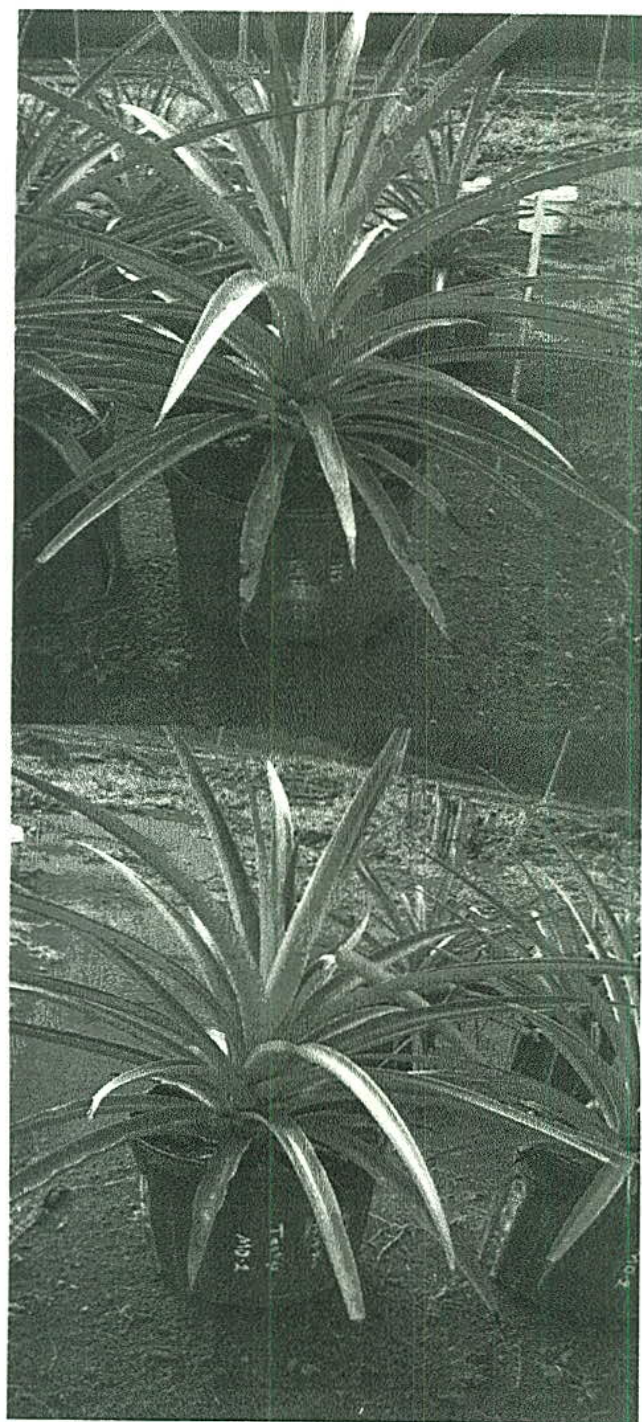
Fig. 10. Shows a 'Rosé' EF2-114 plantation.



Fig 11: shows EF2-114 (left) and MD2 (right) experimental plots.



Fig 12: shows EF2-114 (left) and MD2 (right) meristem culture-derived plants. After 15 weeks growth in greenhouse, ~15 cm long plants were transplanted in pots, and the pictures were taken 11 months later.



Del Monte – Plant Patent – Pineapple Rose

APPLICATION DATA SHEET**APPLICATION INFORMATION**

Application type::	Plant Patent application
Subject matter::	Plant
Suggested classification::	
Suggested Group Art Unit::	
CD-ROM::	no
Sequence submission?::	no
Title::	Pineapple plant named Rosé (EF2-114)
Attorney Docket Number::	Del Monte Rosé
Request for Early Publication?::	No
Request for Non-Publication?::	No
Small Entity?::	Yes
Petition included?::	No

APPLICANT INFORMATION

Applicant Authority Type::	Inventor
Primary Citizenship::	USA
Given name::	Ebrahim
Family name::	Firoozbady
City of Residence::	Coral Gables
State of Residence::	Florida
Street of mailing address::	241 Sevilla Ave
City of mailing address::	Coral Gables
State of mailing address::	FL
Postal code of mailing address::	33134

Del Monte – Plant Patent – Pineapple Rose

Applicant Authority Type:: Inventor
Primary Citizenship:: USA
Given name:: Thomas
Family name:: YOUNG
City of Residence:: Coral Gables
State of Residence:: Florida
Street of mailing address:: 241 Sevilla Ave
City of mailing address:: Coral Gables
State of mailing address:: FL
Postal code of mailing address:: 33134

REPRESENTATIVE INFORMATION

Representative Designation::	Registration Number::	Representative Name::
Primary	45533	John Dodds

CORRESPONDENCE INFORMATION

Name: John Dodds
Street of mailing address: 1707 N St. NW
City of mailing address: Washington
State or Province of mailing: D.C.
Zip Code: 20036
Phone number: 202-463 3275
Fax number: 202-463 3278
E-mail address: j.dodds@doddsassociates.com

Del Monte – Plant Patent – Pineapple Rose

ASSIGNEE INFORMATION:

Name: **Del Monte Fresh Produce Company** 241 Sevilla Ave., Coral Gables, FL 33134

SMALL ENTITY STATUS: Yes

June 4, 2012

DODDS AND ASSOCIATES

By: 

John Dodds

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A QUIEN RECIBA ESTE DOCUMENTO:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos

18 de Julio, 2013

ESTE DOCUMENTO ES PARA CERTIFICAR QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS COMERCIALES DE LOS ESTADOS UNIDOS PARA ESTOS DOCUMENTOS, LA APLICACIÓN DE PATENTE IDENTIFICADA A CONTINUACIÓN SATISFACE LOS REQUISITOS PARA RECIBIR UNA FECHA DE PRESENTACIÓN BAJO 35 USC 111.

NÚMERO DE APLICACIÓN: 13/507,101

FECHA DE PRESENTACIÓN: *Junio 04, 2012*

EL CÓDIGO DEL PAÍS Y EL NÚMERO DE SU APLICACIÓN PRIORITARIA A UTILIZAR PARA LA APLICACIÓN INTERNACIONAL BAJO LA CONVENCION DE PARIS ES
US13/507,101

Bajo la autoridad del
Sub-secretario de Comercio para Propiedad Intelectual
y el Director de la Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos

Original Firmado Ilegible
T. LAWRENCE
Oficial de Certificación

69

PTO/SB/19 (08-08)

Aprobado para el uso el 01/31/2014 .OMB 0851-0032

Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos: DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Bajo la Ley de Reducción de Documentación de 1995, no se requiere que ninguna persona responda a una recopilación de información a menos de que presente un número de país OMB válido

TRANSMISIÓN DE APLICACIÓN DE PATENTE DE PLANTA (Únicamente para aplicaciones no provisionales nuevas presentadas bajo 37 CFR 1.53(b))	No. de Docket del Abogado	Del Monte Pineapple Rose
	Primer inventor nombrado	Ebrahim Firoozabady
	Título	Pineapple named "Rosé"
	No. de etiqueta de correo express	EI 334280387 US

DIRECCIÓN:	Comisionado de patentes P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	13/507,101 06/04/2012
------------	---	--------------------------

ELEMENTOS DE APLICACIÓN <i>Ver los capítulos MPEP 600 & 1600 con respecto a los contenidos de la aplicación de patente.</i>	PARTES DE APLICACIONES ADJUNTAS
1. ☒ Formulario de transferencia de tarifas (e.g., PTO/SB/17) 2. ☒ El solicitante declara estatus de entidad pequeña. Ver 37 CFR 1.27. 3. ☒ Especificación [Total de páginas 15] (el acuerdo preferido se ha mencionado a continuación) - Título descriptivo de la invención - Referencias cruzadas a aplicaciones relacionadas - Declaración con respecto a l y D financiada Federalmente - Nombre en latin del género y la especie - Denominación de variedad - Antecedentes de la invención - Descripción breve de los planos - Descripción botánica detallada - Una sola declaración - Abstracto de la revelación 4. ☐ Plano(s) a color [total de hojas 13] (Se requieren 2 copias – 37 CFR 1.165(b)) 5. Juramento o declaración [Total de hojas] a. ☒ Nueva ejecución (original o copia) b. ☐ Una copia de una aplicación anterior (37 CFR 1.63(d)) (2 continuación/divisional con Caja 16 completada) ☐ ELIMINACIÓN DE INVENTOR (ES) Declaración firmada adjunta para eliminar el/los Inventor(es) mencionados en la aplicación anterior. Ver 37 CFR 1.63(d)(2) y 1.33(b). 6. ☒ Plantilla de datos de la aplicación, Ver 37 CFR 1.76	7. ☒ Documentos de asignación (portada y documento(s)) 8. ☐ Declaración 37 CFR 3.73(b) ☐ Poder legal (cuando haya una persona encargada) 9. ☐ Documento de traducción al inglés (si aplica) 10. ☐ Declaración de revelación de información (IDS) PTO/SB/08 or PTO-1449 ☐ Copias de documentos de patentes internacionales, NPL & aplicaciones pendientes de patentes en Estados Unidos 11. ☐ Enmienda preliminar 12. ☐ Carta con acuse de recibo (MPEP 503) (debe detallarse específicamente) 13. ☐ Copia certificada de documento(s) prioritario(s) (si se declara prioridad internacional) 14. ☐ Solicitar no-publicación bajo 35 U.S.C. 122(b)(2)(B)(i) El solicitante debe adjuntar el formulario PTO/SB/35 o equivalente 15. ☐ Otros: Nota: Por favor declarar el nombre en Latin y la denominación de variedad de la planta declarada en una sección separada de la especificación.

16. Si es una APLICACIÓN CONTINUA, marcar la caja pertinente y suministrar la información necesaria y en la primera oración de la especificación luego del título o en una plantilla de datos de aplicación bajo 37 CFR 1.76.
☐ Continua ☐ Divisional ☐ Continuación parcial (CIP) de la aplicación anterior No.: Información de la aplicación anterior: Examinador Unidad de arte:

17. DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

☒ La dirección relacionada con el número de cliente	27772	☐ Dirección de correspondencia a continuación
---	-------	--

Nombre				
Dirección				
Ciudad	Estado	Código zip		
País	Teléfono	Email		

Firma	Original Firmado Ilegible	Fecha	06/04/2012
Nombre (Imprenta / Escrito)	JOHN DODDS	No. de registro	45 15 33

Esta recolección de información es necesaria de acuerdo con 37 CFR 1.53(0). La información es necesaria para obtener o retener un beneficio del público que es someter (para que la USPTO procese) una aplicación. Confidencialmente está regido por 35 U.S.C. 122 y 37 CFR 1.11 y 1.14. Se estima que esta recolección de datos debe tardar 12 minutos para ser completada, incluyendo la obtención, preparación y el sometimiento del formulario de aplicación completo del USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual. Cualquier comentario sobre la cantidad de tiempo necesaria para completar este formulario y/o las sugerencias para reducir esta carga deben enviarse al Oficial Principal de Información, Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos, Departamento de Comercio de los Estados Unidos, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. 00 NO ENVIAR TARIFAS O FORMULARIOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCIÓN. ENVIAR A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

TRANSMISIÓN DE DERECHOS		Completar si se desconoce	
		Número de aplicación	
		Fecha de sometimiento	
☒ El solicitante declara estatus de entidad pequeña. Ver 37 CFR 1.27.		Primer inventor nombrado	Ebrahim Firoozabady
☐ El solicitante certifica estatus de micro entidad. Ver 37 CFR 1.29. Formulario. PTO/SB/15A o 8 o equivalente deben incluirse o han sido sometidos anteriormente.		Nombre del examinador	
		Unidad de arte	
CANTIDAD TOTAL PAGADA	(\$) 415.00	No. de Docket del practicante	

MÉTODO DE PAGO (marcar todos los que apliquen)

☒ Cheque ☐ Tarjeta de Crédito ☐ Giro postal ☐ Ningún otro (por favor identificar): _____

☐ Número de la cuenta de depósito: _____ Nombre de la cuenta de depósito: _____

Para la cuenta de depósito identificada anteriormente, al Director se le autoriza (marcar todas las que apliquen):

☐ Cargo(s) indicados a continuación ☐ Cargo(s) indicados a continuación, **excepto por los derechos de sometimiento**

☐ Cargar de cualquier cargo adicional o pego menor de derechos ☐ Acreditar cualquier sobre-pago de derechos

bajo 37 CFR 1.16 y 1.17

ADVERTENCIA: La información en este formulario podría ser pública. La información de tarjetas de crédito no debe incluirse en este formulario. Proporcionar la información de tarjetas de crédito y la autorización en el PTO-2038.

CÁLCULO DE DERECHOS

1. SOMETIMIENTO BÁSICO, BÚSQUEDA Y DERECHOS DE EXAMINACIÓN

Tipo de aplicación	DERECHOS DE SOMETIMIENTO		DERECHOS DE BÚSQUEDA		DERECHOS DE EXAMINACIÓN		Derechos pagados (\$)
	Derecho (\$)	Cargo pequeño (\$)	Derecho (\$)	Cargo pequeño (\$)	Derecho (\$)	Cargo pequeño (\$)	
Utilidad	380	190	620	310	250	125	
Diseño	250	125	120	60	160	80	
Planta	250	125	380	190	200	100	415
Re-emisión	380	190	620	310	750	375	
Provisional	250	125	0	0	0	0	

2. DERECHOS ADICIONALES DE DECLARACIÓN

Descripción de derechos	Derechos (\$)	Cargo pequeño (\$)
Cada declaración menos de 20 (incluyendo Reemisiones)	60	30
Cada declaración independiente sobre 3 (incluyendo Reemisiones)	250	125
Múltiples declaraciones dependientes	450	225

Declaraciones totales

-20 or HP = _____ x _____ = _____

HP = mayor número de declaraciones totales pagadas, si es más de 20.

Declaraciones independientes

-3 or HP = _____ x _____ = _____

HP = Mayor número de declaraciones independientes pagadas, si fuese mayor a 3.

3. DERECHOS DEL TAMAÑO DE LA APLICACIÓN

Si la especificación y los planos superan 100 hojas de papel (excluyendo la secuencia sometida electrónicamente o los listados computarizados bajo 37 CFR 1.52(e)), el cargo por tamaño de aplicación es de \$310 (\$155 para entidades pequeñas) por cada 50 hojas adicionales o fracciones. Ver 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) y 37 CFR 1.16(s).

Hojas totales **Hojas adic.** **Número de cada 50 hojas adicionales o fracciones** **Derecho (\$)** **Derechos pagados (\$)**

_____ -100 = _____ / 50 = _____ (redondear hacia arriba a un número entero) x _____ = _____

4. OTROS DERECHO(S)

Especificación en otro idioma, \$130 (no hay descuento de entidad pequeña o micro entidad)

Sometimiento no electrónico bajo 37 CFR 1.16(t) para una aplicación de utilidad, \$400 (\$200 para pequeña o micro entidad)

Otros (e.g., sobrecargo por sometimiento tardío): _____

SOMETIDO POR			
Firma	Original Firmado Ilegible	No. de registro (Abogado / Agente)	Teléfono
		45,533	202-463-3275
Nombre (Impreso / escrito)	JOHN DODDS		Fecha
			06/04/2012

Esta recolección de información es necesaria de acuerdo con 37 CFR 1.53(f). La información es necesaria para obtener o retener un beneficio del público que es someter (para que la USPTO procese) una aplicación. Confidencialmente está regido por 35 U.S.C. 122 y 37 CFR 1.11 y 1.14. Se estima que esta recolección de datos debe tardar 30 minutos para ser completada, incluyendo la obtención, preparación y el sometimiento del formulario de aplicación completo del USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual. Cualquier comentario sobre la cantidad de tiempo necesaria para completar este formulario y/o las sugerencias para reducir esta carga deben enviarse al Oficial Principal de Información, Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos, Departamento de Comercio de los Estados Unidos, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. 00 NO ENVIAR TARIFAS O FORMULARIOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCIÓN. ENVIAR A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Si usted necesita ayuda para completar el formulario, llamar al 1-800-PTO-9199 y seleccionar la opción 2.

Título de la Patente: Planta de piña llamada 'Rosé' (EF2-114)**Descripción:**

Nombre de la especie: *Ananas comosus*.

Denominación de la variedad: 'Rosé', con el nombre del fitomejorador EF2-114.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha desarrollado una nueva variedad de piña (*Ananas comosus*), de la familia Bromeliaceae, utilizando técnicas de ingeniería genética, llamada 'Rosé'. El desarrollo de este proceso tomó 6 años; comenzó en agosto del 2005, utilizando como material de partida coronas de la variedad MD2 (también conocida como piña Del Monte Gold), importadas desde Hawái, para producir brotes en cultivo in vitro, introducir genes y elementos de ADN secciones basales foliares, regenerar plantas completas, realizar pruebas de campo y seleccionar plantas con frutas de color interno rosa o rojo. Las plantas seleccionadas se propagaron asexualmente en el campo y a través de cultivo de meristemos para confirmar los rasgos de colores y otras características relacionadas a las frutas y al rendimiento agronómico.

En cuanto a características y calidad interna de la fruta, la planta es muy similar a la planta madre de MD2. Sin embargo, el color de la pulpa interior de la Rosé es de color rosa o rojo, debido a la acumulación de licopeno en la parte comestible de la fruta. La morfología de la cáscara se conoce como "Tigre" y puede ser que sea tolerante a la ocurrencia natural de la floración. Esta nueva variedad se ajusta mejor al mercado de fruta fresca y la fruta residual se puede procesar como jugo o como producto congelado.

El objetivo principal de la presente invención era producir una variedad de piña única y diferenciada mediante la acumulación de altos niveles de carotenoides: mientras que la misma conservara la mayoría de las características de la línea materna, MD2.

La invención está relacionada a la biosíntesis de carotenoides en plantas de piña. Más específicamente, esta piña novedosa fue producida mediante la transformación genética de células MD2 en cultivo de tejidos y mediante la regeneración de plantas completas (Esquema 1) con la expresión de reguladores que modulan la biosíntesis de licopeno en la sección interna de la fruta. Además, las plantas fueron transformadas con genes que son parte de la biosíntesis del etileno para el control de la floración en plantas.

Los carotenoides son moléculas isoprenoides, ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden ocurrir como pigmentos en frutos, flores, aves y crustáceos. Los animales son

incapaces de sintetizar carotenoides *de novo* y dependen de la dieta como fuente de estos compuestos. Los carotenoides pueden contribuir fundamentalmente a la salud humana y en los últimos años se ha dado un interés considerable por los carotenoides en la dieta, debido a su potencial para aliviar enfermedades en los seres humanos que están relacionadas al envejecimiento. Este hecho se ha visto reflejado en los importantes avances realizados en la clonación de la mayoría de los genes de carotenoides y en la manipulación genética de muchos cultivos con la intención de aumentar sus niveles en la dieta.

En las plantas, los carotenoides son componentes esenciales del aparato fotosintético y son responsables del color rojo, naranja y amarillo de muchas flores y frutas. Nuestra comprensión de la biosíntesis de carotenoides ha avanzado de manera drástica en los últimos años (Hirschberg, 2001; Fraser and Bramley, 2004). La vía utilizada implica una serie de desaturaciones, ciclaciones, hidroxilaciones y epoxidaciones que comienzan con la formulación del fitoeno (Ver Figura 1). Una serie de desaturaciones posteriores es la responsable de la síntesis de licopeno. Después de las reacciones de desaturación, la ciclación de licopeno se cataliza mediante dos enzimas, la beta-ciclasa y la zeta-ciclasa, lo que conduce a la formación de beta-caroteno (dos anillos beta) y alfa caroteno (un anillo beta y un anillo zeta) (Cunningham et al., 1996, 1998).

Los genes de interés se derivan de especies de plantas comestibles, piña (*Ananas comusus*) o mandarina (*Citrus reticulata*). Hemos específicamente sobre-expresado un gen de fitoeno sintasa de mandarina (Psy) (Ikoma et al, 2001). El gen está bajo el control transcripcional del gen inhibidor de la bromelina de la piña (BRI). También hemos suprimido la expresión génica endógena del licopeno β -ciclase (Lyc-b) y/o el licopeno ϵ -ciclase (Lyc-e) mediante la tecnología de ARN de interferencia (ARNi) con el fin de aumentar la acumulación de licopeno en los tejidos comestibles de fruta de la piña (Young, T. and Firoozabady, E. 2010, Patente de los Estados Unidos 7, 663, 021). Hemos construido secuencias de sentido y antisentido de los genes Lyc-b y Lyc-e derivados de la piña, las cuales son separadas por un intrón del gen fotoinducible y específico para tejido LS1 derivado de la papa (*Solanum tuberosum*) con el fin de formar una estructura de horquilla. Estos genes se encuentran bajo el control transcripcional del promotor del gen inhibidor de la bromelina, que impulsa la sobreexpresión en la fruta del constructo de ARNi (Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005).

La inducción floral puede ocurrir naturalmente, principalmente en presencia de temperaturas bajas y días cortos. La floración natural de las plantas de piña es un problema importante en la industria. Para obtener la característica del control de floración hemos alterado la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de etileno. El etileno es un regulador de crecimiento que juega un papel importante en todas

las fases de desarrollo de la planta, incluyendo la germinación de semillas, la maduración de fruto, la senescencia de hojas y flores y la abscisión. En las plantas, el etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina (Ver Figura 2). El precursor inmediato del etileno en plantas vasculares es el ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) (Adams and Yang, 1979).

El etileno es conocido por inhibir la floración en la mayoría de las plantas. En mango y piña, el etileno promueve la floración (Salisbury y Ross, 1992). Se han utilizado el etileno, los compuestos que producen etileno y las auxinas para inducir la floración en la producción comercial de la piña (Turnbull et al., 1993).

Hemos aislado un gen de la ACC sintasa (fIACCS) cuya expresión es específica en el meristemo de piña y construido secuencias sentido y antisentido del gen de la ACC sintasa, las cuales son separadas por un intrón del gen fotoinducible específico de tejido LS1 derivado de papa (*Solanum tuberosum*) para formar una estructura de horquilla para la supresión por ARNi de la ACC sintasa endógena. El constructo de ARNi está bajo el control transcripcional del promotor específico de meristemo ACC derivado de la piña.

Método de Transformación

La piña fue transformada, siguiendo un método descrito por Firoozabady (Patente de EE.UU. Nº 8049,067) mediante una transformación de los tejidos organogénicos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas de *Agrobacterium* fueron co-cultivadas con tejidos receptores de piña, para lograr tantos fenotipos con alto contenido de carotenoides como de floración controlada, estas cepas contenían un plásmido de transformación, ya sea para aumentar la biosíntesis de carotenoides o para disminuir la biosíntesis de etileno. Se seleccionaron presuntos tejidos transformados en medio que contenía closulfuron y posteriormente fueron revisados para detectar la presencia de genes mediante PCR.

A. tumefaciens, [Cepa GV3101] (Koncz y Schell, 1986), es una cepa de *Agrobacterium*, comúnmente utilizado para la entrega de ADN de transferencia (ADN-T) en células vegetales. Se insertaron diferentes genes dentro del ADN-T de un vector binario (Ver Figura 3) para la transformación de la piña. El Psy derivado de *Citrus reticulata*, mandarina (Ikoma et al, 2001), codifica una enzima que convierte geranilgeranil pirofosfato (GGPP) en cis-fitoeno, un intermediario en la biosíntesis de licopeno y beta-caroteno.

El gen de la licopeno beta-ciclasa (Lyc-b) derivado de la piña *Ananas comosus*, codifica una enzima que convierte el licopeno en gama-caroteno, un precursor metabólico del beta-caroteno.

El gen de la enzima licopeno épsilon-ciclasa (Lyc-e), proveniente de *A. comosus*, codifica una enzima que convierte el licopeno en sigma-caroteno, un precursor metabólico de alfa-caroteno.

El gen modificado (surBHRA) acetolactato sintasa (ALS) (Chaleff, R. S., y Mauvais, C. J., 1984) (ALS) derivado del tabaco *Nicotiana tabacum*, cataliza la biosíntesis de aminoácidos ramificados incluso en presencia de clorsulfurón (Lee, K. et al., 1988), lo cual permite la selección de células transformadas de piña.

El plásmido pHCW1 usado para las transformaciones de piña, fue construido por el Laboratorio de Del Monte Fresh Produce Company en Richmond, California, EUA. pHCW1 contiene un gen resistente a la tetraciclina (tetRA) proveniente del plásmido RP1 y el origen de replicación del plásmido pACYC, que permite la sección que permite la selección y mantenimiento en *Escherichia coli* y el replicón pVS1 derivado del *Pseudomonas aeruginosa*, que asegura la replicación en *Agrobacterium tumefaciens*. pHCW1 contiene la secuencia de 25 bases par que delimita la transferencia de ADN -T a la secuencia de

100 bases sintéticas entre los límites que forman múltiples sitios de restricción de clonación para permitir la integración de diferentes casetes de ADN -T (Ver Cuadro 1).

Se utilizó el plásmido pCHW1 para crear pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2 plásmidos de vector binario. Se transfirieron los vectores binarios a la cepa GV3101 desarmada de *A. tumefaciens*. El GV3101 con el vector pHCW.T-7 fue nombrado AG76 y el del vector pHCWflACC3'-2 fue nombrado AG62 (Ver Figura 4). Se mezclaron AG76 y AG62 para la transformación de la piña. Los elementos genéticos de los vectores se describen en los Cuadros 2 y 3.

La ingeniería genética del MD2 se llevó a cabo en el Laboratorio de Del Monte Fresh Produce Company en Richmond, California, USA, donde se produjeron plantas transgénicas y se propagaron en cultivo de tejidos. Los propágulos fueron luego llevados al área de investigación de la Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte, S.A. (Pindeco), Buenos Aires, Puntarenas, Costa Rica para su evaluación de campo, para la propagación en el campo y para la propagación en masa de esta variedad en el laboratorio.

RESUMEN DEL INVENTO

Se ha desarrollado una nueva variedad de piña (*Ananas comosus*), de la familia Bromeliaceae, utilizando técnicas de ingeniería genética, llamada 'Rosé' o EF2-114. Se utilizó como material de partida coronas de la variedad MD2 (también conocida como

piña Del Monte Gold) para producir brotes en cultivo in vitro, introducir genes y elementos de ADN en secciones basales foliares, regenerar plantas completas, realizar pruebas de campo y seleccionar plantas con frutas de color interno rosa o rojo. Las plantas seleccionadas se propagaron asexualmente en el campo y a través de cultivo de meristemos para confirmar los rasgos de colores y otras características relacionadas a las frutas y al rendimiento agronómico. El invento tiene que ver con la producción de una variedad nueva y diferente de la familia de la piña, Bromeliaceae.

La nueva variedad de planta EF2-114 se caracteriza por el color rosa o rojo de la pulpa y por el color "Tigre" de la cáscara, en comparación a la línea materna, MD2, y puede ser que sea tolerante a la ocurrencia natural de la floración.

El color interno de la fruta puede variar de acuerdo a la etapa de maduración (Figura 5). El rasgo "Tigre" se definió como el color que tiene la cáscara en el hombro de cada fruto en desarrollo, que es una combinación de colores verde, amarillo, naranja (y rojo) debido a la expresión de los genes de carotenoides en la cáscara (Figuras 6-8). La morfología de la planta en general es igual que la de la planta madre MD2 (Figuras 9-12).

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA

La descripción de la nueva variedad se basa en la observación de ejemplares que recibieron buena nutrición y que fueron cultivados bajo condiciones de campo, en la

región de Buenos Aires de Costa Rica, donde la temperatura generalmente oscila entre 14° C y 37° C y la precipitación promedio anual es de 3251 mm.

Se cultivaron las plantas en la estación experimental en Buenos Aires, Puntarenas, Costa Rica.

Todas las características de la fruta y de la planta, incluyendo la terminología del color y designación del color que se mencionan en este documento se ajustan a los Descriptores brasileños para MD2 (Cuadro 4). Básicamente, “Rosé” es igual que MD2 para todas las características de la fruta y de la planta, con la excepción del color interno de la fruta, el rasgo “Tigre” y posiblemente el rasgo del control de la floración. Ver Descriptores brasileños para MD2 adjunto.

IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA:

- Nombre: *Ananas comosus*.
- Parentesco: MD2.
- Origen: Ingeniería genética de MD2 seguido por la selección de los rasgos de interés en las pruebas de campo.

- Botánica: Bromeliaceae o familia de la piña. Subfamilia: Bromelioideae. Género: Ananas. Subgénero: comosus. Variedad: "Rosé", nombre del mejorador EF2-114.
- Comercial: Bromelia frutal.

General:

- Fertilidad - Como cualquier otra planta adulta de piña, esta planta es auto-incompatible. Por esta razón, rara vez se observan semillas. La propagación comercial se hace por medio de propágulos vegetativos (retoños, brotes y tallos) y coronas de la fruta.
- Vigor - se considera que el vigor de la planta es similar al de la planta madre, MD2.
- Rendimiento – el rendimiento estimado es igual al MD2, 120-125 MT/ha en la primera cosecha y de 95-100 MT/ha en la segunda cosecha.
- Mercado - la fruta será designada para el mercado internacional de frutas y comercializada dentro del mercado de fruta fresca. La fruta residual se puede procesar como zumo o producto congelado.

Lo que se reivindica es:

1. Una variedad nueva y distinta de la planta *Ananas comosus* llamada 'Rosé' con el nombre del fitomejorador EF2-114, como se presenta y describe en este documento.

Resumen:

Se proporciona una nueva variedad de piña llamada 'Rosé'. El color interno rojo o rosa junto con la morfología única de la cáscara y la posibilidad del rasgo de control de floración son rasgos de esta nueva variedad.

Cuadro 1.Elementos Genéticos del plásmido pHCW1

Elemento Genético	Origen y función
RB	Una secuencia de nucleótido de 25 bp que actúa como el punto inicial de la transferencia del ADN a células vegetales que fue aislado originalmente a partir de pTiT37 (Depicker et al., 1982).
pVS1	El replicón pVS1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , que asegura la replicación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al., 1984).
TetRA	Un gen resistente a la tetraciclina del plásmido RP1, que permite la selección del plásmido binario en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Escherichia coli</i> (Waters et al., 1983).
pACYC	El origen de la replicación del plásmido pACYC, que asegura la replicación en <i>Escherichia coli</i> (Chang et al., 1979).
LB	Una secuencia de 25 nucleótidos que delimita la transferencia ADN-T y actúa como el punto final de la transferencia de ADN en células vegetales. Se aisló originalmente del TiA6 (Barker et al., 1983).
MCS	Una secuencia de 110 nucleótidos creada sintéticamente, que se compone de sitios de restricción de clonaje múltiples que permiten la integración de diferentes casetes al plásmido.

Cuadro 2. Elementos Genéticos del ADN -T en el plásmido pHCW.T-7 en AG76

Elemento Genético	Tamaño (Kb)	Función (Referencia)
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado del gen inhibidor de bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que impulsa la expresión mejorada de la fruta del gen(es) meta.
Psy	1.131	Un gen sintasa fitoeno (Psy) de <i>Citrus reticulata</i> , idéntico al gen aislado de la fruta de mandarina (Ikoma et al. 2001), que codifica una enzima en la biosíntesis carotenoide.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia de poliadenilación del gen ubiquitina (Ubi) de <i>Ananas comosus</i> finaliza la transcripción del transgen (es).
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado de la secuencia promotora del gen inhibidor de bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que dirige la expresión mejorada de la fruta del transgen ARNi.
eLyc fragmento con sentido	0.504	Un fragmento del gen licopeno ϵ -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en la orientación de sentido, que se usa en un sistema de expresión de ARNi para regular a la baja el licopeno endógeno ϵ -ciclase, una enzima en la biosíntesis de carotenoides.
ST-LS1	0.193	Un intrón del gen ST-LS1 específico de tejido fotoinducible procedente de <i>Solanum tuberosum</i> que funciona como un espaciador entre los fragmentos de gen del sentido y antisentido para mejorar la estabilidad del vector.
eLyc fragmento antisentido	0.504	Un fragmento del gen licopeno ϵ -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en la orientación antisentido, que se usa en un sistema de expresión del ARNi para regular a la baja el licopeno ϵ -ciclase endógeno, una enzima en la biosíntesis carotenoide.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia de poliadenilación del gen ubiquitina (Ubi) de <i>Ananas comosus</i> que finaliza la transcripción del transgen ARNi.
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado de la secuencia de promotores de un gen inhibidor de bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que dirige la expresión mejorada de la fruta del transgen ARNi.
b-Lyc fragmento con sentido	0.619	Un fragmento del gen licopeno β -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en la orientación a sentido, que se usa en un sistema de expresión del ARNi para regular a la baja el licopeno β -ciclase endógeno,

		una enzima en la biosíntesis carotenoide.
ST-LS1	0.193	Un intrón del gen ST-LS1 específico para tejido foto inducible de <i>Solanum tuberosum</i> (Eckes et al, 1986) que funciona como espaciador entre fragmentos de gen a sentido y contrasentido estimulando la estabilidad del vector.
b-Lyc fragmento anti-sentido	0.619	Un fragmento del gen licopeno β -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en orientación contrasentido, que se usa en un sistema de expresión del ARNi para regular a la baja el licopeno β -ciclase endógeno, una enzima en la biosíntesis carotenoide.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia de poliadenilación del gen ubiquitina (Ubip) de <i>Ananas comosus</i> finaliza la transcripción del transgen ARNi.
Marcador Seleccionable		
EHS1.7-Ubp1.5	4.257	Un promotor derivado del gen epóxido hidrolasa (EHS) fusionado al promotor de gen ubiquitina (Ubip) y al intrón nativo de <i>Ananas comosus</i> que dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable.
EHS1.7	1.7	Un promotor derivado del gen epóxido hidrolasa (EHS) de <i>Ananas comosus</i> (Neuteboom et al, 2002) que dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable.
Ubp1.5	1.5 + 1.057	Un promotor de gen ubiquitina tetramérico de 1.5 kb de la piña (<i>Ananas comosus</i>), que dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable. El promotor incluye una secuencia de intrón endógena de 1057.
ALS	1.17	Un gen sintasa acetolactato mutante del tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>), que le confiere resistencia al closulfuron y permite la escogencia de células vegetales transformadas (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).
ALS 3'	2.7	Un terminador endógeno derivado de la señal no traducida de la poliadenilación del gen de la acetohidroxiácido sintasa (ALS) de <i>Nicotiana tabacum</i> (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).

92

Cuadro 3. Elementos Genéticos del ADN -T en el plásmido pHCWflACC3'-2 en AG62. Los elementos son los mismos ya mencionados (Cuadro 2) con la excepción de los mencionados a continuación.

Elemento Genético	Tamaño (Kb)	Función (Referencia)
flACS(+sentido	0.406	Una secuencia 3' de 406 bp del gen de la ACC sintetasa cuya expresión es específica en el meristemo, aislado de la piña (<i>A. comosus</i> , en orientación a sentido, que se usa en el sistema de expresión del ARNi para regular a la baja la sintetasa ACC endógena, una enzima clave en la biosíntesis de etileno, produciendo así una planta que exhibe características mejoradas tales como una floración tardía.
flACS(-) antisentido	0.406	Una secuencia 3' de 406 bp del gen de la ACC sintetasa cuya expresión es específica en el meristemo, aislada de la piña (<i>A. comosus</i>), en la orientación de antisentido.

Esquema, 1: la producción de piñas EF2-114.

Etapa	Fecha (duración)
Llegan frutas inmaduras de MD2 (40 días anteriores a la cosecha), provenientes de Hawái	10/8/2005
Se aislaron y cultivaron meristemos de la corona	17/8/2005
Se establece el cultivo del brote y se propaga <i>in vitro</i>	de 17/8/2005 a 20/9/2006
Se prepararon y cultivaron secciones longitudinales de los brotes	de 20/9/2006 a 29/9/2009
Se prepararon secciones basales foliares y se mezclaron con las cepas AG-62 y Ag-76 de <i>Agrobacterium</i> y se co-cultivaron durante tres días	de 29/9/2006 a 02/10/2006
Se transfirieron las bases foliares a un medio de recuperación con carbenicilina (para matar el <i>Agrobacterium</i>)	de 02/10/2006 a 27/10/2006
Se transfirieron las bases foliares a un medio de selección con antibióticos (para matar cualquier <i>Agrobacterium</i> residual) y clorsulfuron, CS (un herbicida), para la selección de células vegetales transformadas y para producir materiales organogénicos transformados. Se llevaron a cabo un total de 7 transferencias con una presión de selección creciente para producir pequeños botones transgénicos.	27/10/2006, 2/11/2006, 14/11/2006, 4/12/2006, 3/1/2007, 29/1/2007, 15/2/2007
Se transfirieron pequeños grupos de brotes (dos veces) a un medio con CS y antibióticos para seguir cultivando y transformando los brotes y botones de brote	13/3/2007, 29/3/2007
Se transfirieron brotes y botones de brote a un medio con un alto nivel de Agar (8 y 10 g/l) para normalizar los brotes y botones de brote transformados	10/4/2007
Se transfirieron grupos de brotes a un medio con CS, antibióticos, Agar (7-10) y hormonas para normalizar y propagar los brotes.	de 4/5/2007 a 14/12/2007
Un evento conocido como 16.184.1 incluye 14 líneas sub-cultivadas en un medio líquido para su crecimiento adicional	21/1/2008
Se enviaron 9 líneas o grupos adicionales del	14/2/2008

evento 16.184.1 (compuesto de 349 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los 9 grupos se enumeraron como 109-117 en Pindeco y se cultivaron en el invernadero para crecimiento adicional y pruebas de campo.	
Se enviaron 2 líneas o grupos adicionales del evento 16.184.1 (compuesto de 85 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los grupos se enumeraron como 208 y 209 en Pindeco y se cultivaron en el invernadero para crecimiento adicional y pruebas de campo.	1/8/2008
Los análisis PCR confirmaron que los genes están presentes en las muestras de tejido de los brotes derivados del cultivo del evento	26/8/2008
Se enviaron 2 líneas o grupos adicionales del evento 16.184.1 (compuesto de 150 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los grupos se enumeraron como 345 y 346 en Pindeco, y se cultivaron en el invernadero para crecimiento adicional y pruebas de campo.	26/1/2009
Las plantas se cultivaron en el invernadero durante 15-20 semanas antes de ser transferidas al suelo para las pruebas de campo. Los frutos se cortaron para evaluar su coloración interna. Durante las pruebas de campo, los grupos 109, 110, 114, 116, 208, y 346 mostraron una coloración interna rosa o roja. De la calidad interna (Brix, ácido cítrico, ácido ascórbico y pH) se midieron en los frutos de color y se cultivaron propágulos para la evaluación de futuras generaciones. Los análisis moleculares (PCR y Southern) confirmaron la presencia de los genes. El análisis Southern además confirmó que todos los de este grupo son de un transgénico, que se conoce colectivamente como EF2-114	2009-2012



82

Cuadro 4. LOS DESCRIPTORES MÍNIMOS PARA LA PIÑA (*Ananas comosus* (L.) Merrill)

Nombre propuesto para la variedad MD-2

(+) Ver punto "VI. OBSERVACIONES Y FIGURAS".

Características	Descripción de la característica	Código para cada descripción MD-2
1. Planta: actitud (+)	semi-erguida	
	intermediaria	
	abierta	<u>7</u>
2. Planta: número de hojas activas (+)	bajo	
	intermedio	<u>5</u>
	alto	
3. Hoja: largo (+)	corto	
	intermedio	<u>5</u>
	largo	
4. Hoja: ancho (+)	delgado	
	intermedio	<u>5</u>
	ancho	
5. Hoja: color que predomina en la cara superior	verde claro	
	verde oscuro	<u>2</u>
	morado-verde	
	verde-morado	
	morado	
	rojo	
6. Hoja: coloración antiociánica	ausente	<u>1</u>
	presente	

09

7. Hoja: jaspeado	<i>ausente</i>	<u>1</u>
	<i>presente</i>	
8. Hoja: espinas (+)	<i>ausente</i>	
	<i>inconspicuas</i>	<u>2</u>
	<i>conspicuas</i>	
9. Hoja: distribución de las espinas en el margen (+)	<i>sólo en la base</i>	
	<i>sólo en el ápice</i>	<u>2</u>
	<i>en la base y el ápice</i>	
	<i>regular</i>	
	<i>irregular</i>	
10. Inflorescencia: número de flores (+)	<i>bajo</i>	
	<i>intermedio</i>	<u>5</u>
	<i>alto</i>	
11. Flor: color predominante del sépalo	<i>blancuzco</i>	
	<i>verdoso</i>	
	<i>purpurino</i>	<u>3</u>
12. Flor: base de los pétalos	<i>libre</i>	<u>1</u>
	<i>fusionada</i>	
13. Flor: pétalos imbricados	<i>ausente</i>	
	<i>presente</i>	<u>2</u>
14. Flor: color predominante de la punta del pétalo	<i>blancuzco</i>	
	<i>morado claro</i>	
	<i>morado</i>	<u>5</u>
	<i>morado oscuro</i>	
15. Flor: proporción del color blanco en los pétalos (+)	<i>bajo</i>	<u>3</u>
	<i>intermedio</i>	
	<i>alto</i>	

92

16. Flor: disposición de las anteras	<i>separadas</i>	
	<i>agrupadas</i>	<u>2</u>
17. Flor: cantidad de polen en las anteras	<i>bajo</i>	<u>3</u>
	<i>intermedio</i>	
	<i>alto</i>	
18. Flor: longitud del estilo (+)	<i>corto</i>	
	<i>intermedio</i>	<u>2</u>
	<i>largo</i>	
19. Retoños: cantidad (+)	<i>bajo</i>	
	<i>intermedio</i>	<u>5</u>
	<i>alto</i>	
20. Pedúnculo: longitud (+)	<i>corto</i>	<u>3</u>
	<i>intermedio</i>	
	<i>largo</i>	
21. Pedúnculo: diámetro en la parte central (+)	<i>pequeño</i>	
	<i>mediano</i>	<u>5</u>
	<i>grande</i>	
22. Pedúnculo: cantidad de <u>hijos/bulbos/injertos</u> (+)	<i>(ausente o muy bajo)</i>	
	<i>(bajo)</i>	
	<i>(intermedio)</i>	<u>3</u>
	<i>(alto)</i>	
	<i>(muy alto)</i>	
23. Pedúnculo: número de brácteas	<i>bajo</i>	
	<i>intermedio</i>	<u>5</u>
	<i>alto</i>	

85

24. Pedúnculo: brácteas imbricadas	<i>ausente</i>	
	<i>presente</i>	<u>2</u>
25. Pedúnculo: tricomas	<i>ausente</i>	
	<i>presente</i>	<u>2</u>
26. Fruto: longitud (+)	<i>corto</i>	
	<i>intermedio</i>	<u>5</u>
	<i>largo</i>	
27. Fruto: diámetro en la base (+)	<i>pequeño</i>	
	<i>mediano</i>	
	<i>grande</i>	<u>1</u>
28. Fruto: diámetro en la parte central	<i>pequeño</i>	
	<i>mediano</i>	
	<i>grande</i>	<u>1</u>
29. Fruto: diámetro de la punta (+)	<i>pequeño</i>	
	<i>mediano</i>	
	<i>grande</i>	<u>1</u>
30. Fruto: forma (+)	<i>cónico</i>	
	<i>cónico a cilíndrico</i>	
	<i>cilíndrico</i>	<u>3</u>
	<i>elíptico</i>	
	<i>global/esférico</i>	
31. Fruto: color antes de la madurez fisiológica, con fruta completamente formada	<i>verde plateado</i>	
	<i>verde claro</i>	
	<i>verde verde oscuro</i>	<u>4</u>
	<i>rojo</i>	
	<i>r morado</i>	

69

32. Fruto: color de la piel en el momento de consumo	(verde)	
	(verde con puntos amarillos)	
	(amarillo claro)	
	(amarillo oro)	
	(naranja rojizo)	<u>4</u>
	(morado)	
33. Fruto: homogeneidad de la piel	ausente	
	presente	<u>2</u>
34. Fruto: número de tallos basales frutales	(ausente o muy bajo)	<u>1</u>
	(bajo)	
	(intermedio)	
	(alto)	
	(muy alto)	
35. Fruto: frutos desprendibles	ausente	<u>1</u>
	presente	
36. Fruto: relieve del fruto	plano	<u>1</u>
	prominente	
	muy prominente	
37. Fruto: color de la pulpa	blanco a crema	
	amarillo	
	amarillo oro	<u>3</u>
	anaranjado	

38. Fruto: firmeza de la pulpa	suave	
	intermedio	
	firme	<u>7</u>
39. Fruto: fibrosidad de la pulpa	bajo	
	intermedio	<u>5</u>
	alto	
40. Fruto: succulencia	bajo	
	intermedio	<u>5</u>
	alto	
41. Fruto: diámetro del eje central (+)	pequeño	
	mediano	
	grande	<u>7</u>
42. Fruto: concentración de sólidos solubles (Grados Brix) (+)	bajo	
	intermedio	<u>5</u>
	alto	
43. Fruto: acidez (fijado en porcentaje) (+)	bajo	
	intermedio	<u>5</u>
	alto	
44. Fruto: sabor	débil	
	intermedio	<u>5</u>
	fuerte	
45. Corona: posición	erguida	
	abierta	<u>3</u>
	<u>decumbente</u>	
46. Corona: longitud (+)	corto	
	intermedio	<u>5</u>
	largo	

47. Corona: peso (+)	bajo	
	intermedio	
	alto	<u>7</u>
48. Corona: tendencia a múltiples coronas	(ausente o muy bajo)	
	(bajo)	
	(intermedio)	<u>3</u>
	(alto)	
	(muy alto)	

CARACTERÍSTICA COMPLEMENTARIA

49. Resistencia a fusarium
(Fusarium subglutinans)
- (alta resistencia)
- (resistente)
- (resistencia intermedia)
- (susceptibilidad intermedia)
- (susceptible)
- (alta susceptibilidad)

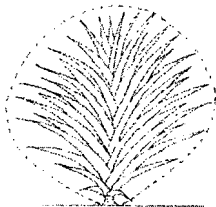
VI.

OBSERVACIONES Y FIGURAS

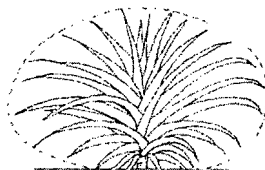
Característica 1. Planta: actitud



3
semi-erguida



5
intermediaria



7
abierta

Característica 2. Planta: número de hojas activas

(bajo)	< 40
(intermedio)	40 – 60
(alto)	> 60

Característica 3. Hoja: longitud

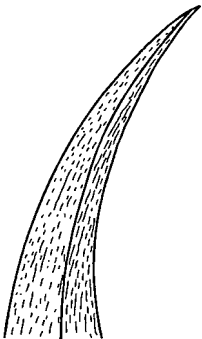
(corto)	< 90 cm
(intermedio)	90 – 120 cm
(largo)	> 120 cm

Característica 4. Hoja: ancho

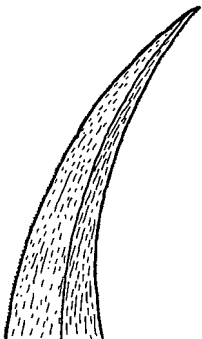
(delgado)	< 6,0 cm
(intermedio)	– 6,0 a 7,0 cm
(ancho)	> 7,0 cm

Característica 8. Hoja: espina y 9. Hoja: distribución de las espinas en el margen

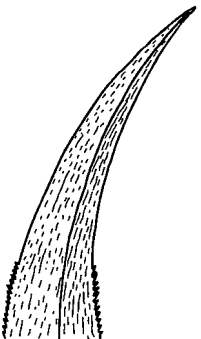
Espinas “inconspicuas” son espinas microscópicas que pueden ser detectadas por el tacto. Cuando pasamos nuestras manos en los márgenes de las hojas, se parece a la lija. (Espinas “conspicuas” son espinas que son visibles a simple vista.)



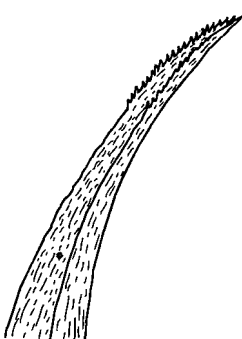
ausente



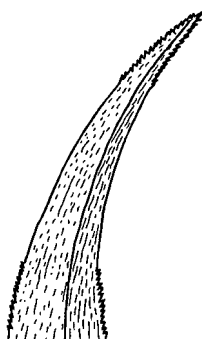
inconspicuo



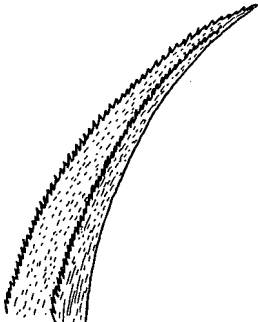
en la base



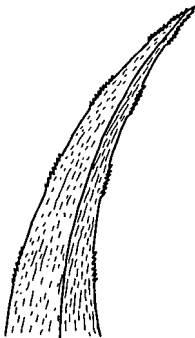
(en el ápice)



en la base y el ápice



regular



irregular

Característica 10. Inflorescencia: número de flores

(bajo)	< 130
(intermedio)	130 – 170
(alto)	> 170

Característica 15. Flor: proporción del color blanco en los pétalos

(bajo)	< 30 %
(intermedio)	30 – 60 %
(alto)	> 60 %

Característica 18. Flor: longitud del estilo

- Corto: *más corto que los estambres*
- Intermedio: *del mismo largo que los estambres*
- Largo: *más largo que los estambres*

Característica 19. Retoño: cantidad

(bajo)	< 1
(intermedio)	1 – 2

(alto) > 2

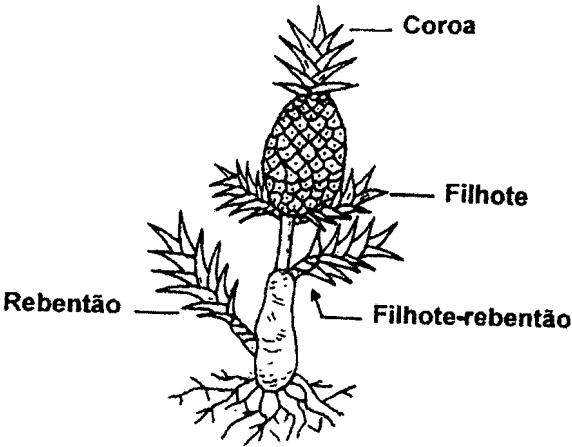
Característica 20 . Pedúnculo: longitud

- (corto) < 18 cm
- (intermedio) – 28 cm
- (largo) > 28 cm

Característica 21. Pedúnculo: diámetro en la parte central

- (pequeño) < 2,5 cm
- (mediano) 2,5 – 3,5 cm
- (grande) > 3,5 cm

Característica 22. Pedúnculo: cantidad de tallos



- (bajo) < 5
- (intermedio) 5 – 10
- (alto) > 10

Característica 26. Fruto: longitud. Medido desde la base hasta la parte superior, sin tomar en cuenta la corona

(corto)	< 15 cm
(intermedio)	15 – 20 cm
(largo)	> 20 cm

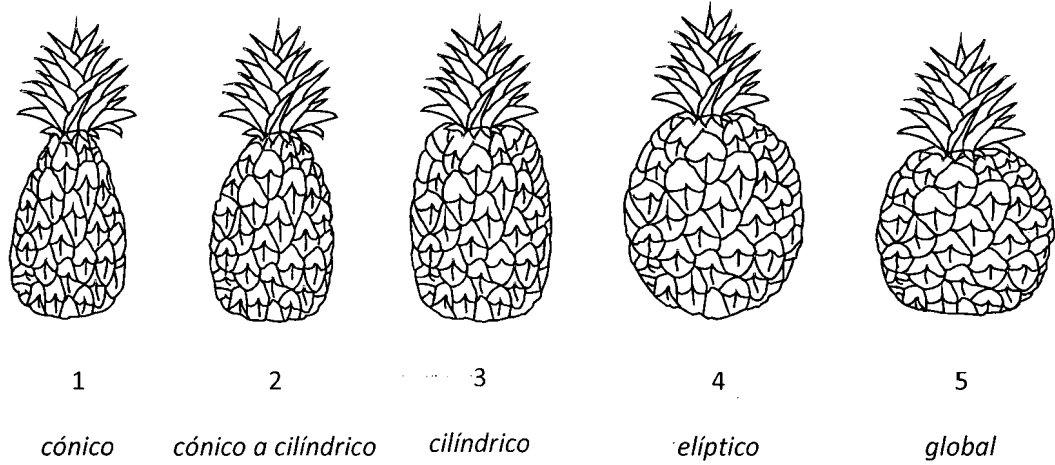
Característica 27. Fruto: diámetro de la base

(pequeño)	< 10 cm
(mediano)	10 – 12 cm
(grande)	> 12 cm

Característica 29. Fruto: diámetro de la punta

(pequeño)	< 6 cm
(mediano)	6 - 10 cm
(grande)	> 10 cm

Característica 30. Fruto: forma



Característica 34. Fruto: numero de tallos basales frutales

(bajo)	< 1
(intermedio)	1 – 2
(alto)	> 2

Característica 41. Fruto: diámetro del eje central

(pequeño)	< 1,5 cm
(mediano)	1,5 – 2,5 cm
(grande)	> 2,5 cm

Característica 42. Fruto: concentración de sólidos solubles (Grados Brix)

(bajo)	< 13
(intermedio)	13 – 16
(alto)	> 16

Característica 43. Fruto: acidez (fijado en porcentaje)

(bajo)	< 0,5
(intermedio)	0,5 – 0,7
(alto)	> 0,7

Característica 46. Corona: longitud

(corto)	< 15 cm
(intermedio)	15 – 20 cm
(largo)	> 20 cm

Característica 47. Corona: peso

(bajo)	< 100 g
(intermedio)	100 – 130 g
(alto)	> 130 g

REFERENCIAS:

1. Adams DO, Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **76**(1):170–174.
2. Barker, R., Idler, K., Thompson, D., Kemp, J. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2:335-350.
3. Chaleff, R. S., and Mauvais, C. J. (1984) Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224:1443-1445.
4. **Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978).** *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15a cryptic miniplasmid.* *J Bacteriol* 134, 1141-1156
5. **Cunningham, F.X., Pogson, B.J., Sun, Z., McDonald, K., DellaPenna, D., and Gantt, E. (1996).** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613–1626.
6. **Cunningham, F.X., Jr., and Gantt, E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 557–583.
7. DePicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H. M. (1983) Nucleotide sequences and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-511.
8. Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L., (1986) Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots, *Mol. Gen. Genet.* 205, 14-22
9. Firoozabady, E. US Patent No. 8049067, Organogenic transformation and regeneration.
10. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-65
11. **Hirschberg, J. (2001).** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 210–218.
12. Hirschberg, I, M. Cohen, M. Harker, T. Lota, V Mann, and I. Pecker. 1997. Molecular genetics of carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 69:2145-2150.
13. Ikoma, Yoshinori, Akira Komatsub, Masayuki Kitac, Kazunori Ogawad, Mitsuo Omurac, Masamichi Yanoc and Takaya Moriguchi, (2001) Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 111: 232–238.
14. Itoh, Y., Watson, J.M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220.
15. Koncz C, and Schell J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383–396
16. Lee, K. et al., (1988) The molecular basis for sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
17. Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D, Christopher DA, 2002. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science*, 165:1021-103 5.
18. Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*, 4th ed., a. Wadsworth.

19. TURNBULL, C.G.N.; NISSEN, R.J.; SINCLAIR, E.R.; ANDERSON, K.L.; SHORTER, A.J. Ethephon and causes of flowering failure in pineapple. *Acta Horticulturae*, Honolulu, n.334, p. 83-88, out, 1993.
20. Young, T. and Firoozabady, E. 2010, United States Patent 7,663,021. Transgenic pineapple plants with modified carotenoid levels and methods of their production
21. Waters, S. H., Rogowski, P., Ginsted, J., Altenbuchner, J., and Schmidt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721; nucleotide sequence analysis. *Nuc. Acids Res.* 11(17):6089-6105.
22. Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005, patent PUBLICATION NUMBER- 2006113709/WO-A2 Plant promoters, terminators, genes, vectors and related transformed plants.

DECLARACIÓN DE APLICACIÓN PARA PATENTE DE PLANTA (35 U.S.C. 161) (37 CFR 1.63)			Número de Docket del abogado	
			Primer inventor nombrado	
			COMPLETAR SI SE CONOCE	
☒ Declaración sometida con el sometimiento inicial	O	☐ Declaración sometida luego del sometimiento (cargo adicional (37 CFR 1.16(e)) requerido)	Número de aplicación	
			Fecha de sometimiento	
			Unidad de arte	
			Nombre del examinador	

De este modo declare qué:

La residencia, la dirección y la ciudadanía de cada inventor se han incluido junto a su nombre.

Considero que el nombre de el/los inventor(es) son el nombre del inventor original y del primer inventor de la nueva variedad de:

Ebrahim Firoozabady, 3009 Shetland Dr., Pleasant Hill, CA 94523, US Citizen.

la planta llamada: 'Rose' (EF2-114)

Lo que se ha declarado y para la planta para la que se busca la patente, cuya aplicación

☐ se ha adjuntada aquí ☒ se sometió el (MM/DD/AAAA) en los Estados Unidos

Número de aplicación y se enmendó el (MM/DD/ AAAA) (si aplica).

Por este medio certifico que he revisado y comprendo los contenidos de la aplicación identificada anteriormente, incluyendo la declaración, según los cambios de las enmiendas mencionadas anteriormente.

He reproducido la planta para de esta aplicación de manera asexual.

☐ Esta planta se encontró en el área cultivada (marcar esta caja únicamente para plantas nuevas)

Reconozco la responsabilidad de revelar información que es pertinente a la patentabilidad de acuerdo con 37 CFR 1.56, incluyendo para la continuación de aplicaciones en parte, la información material, la cual estaba disponible entre la fecha de sometimiento y la aplicación anterior y la fecha de sometimiento internacional PCT o Nacional de la continuación en parte.

Por este medio declaro beneficios de prioridad extranjera bajo 35 U.S.C. 119(a)-(d) o (f), o 365(b) de cualquier aplicación de patente, certificado de derechos de criadores o inventores en la cual se designó al menos un país adicional a los Estados Unidos de América, los mismos se han listado e identificado a continuación marcando la caja, cualquier aplicación extranjera para inventores de patentes o certificados de derechos de criadores, o cualquier aplicación internacional PCT que tenga una fecha de sometimiento previa a la de la aplicación sobre la cual se está declarando prioridad.

Número(s) de aplicación(es) Internacional(es) previa(s)	País	Fecha de sometimiento internacional (MM/DD/AAAA)	Únicamente marcar si no se declara prioridad	Se adjunta la copia certificada?	
			☐	☐ SÍ	☐ NO
			☐	☐	☐
			☐	☐	☐
			☐	☐	☐

☐ Los números de aplicación internacional adicionales se han listado en la página de datos de prioridad suplementaria TO/SB/02B adjunta.

DECLARACIÓN (37 CFR 1.63) PARA APLICACIÓN DE PLANTAS UTILIZANDO LA PLANTILLA DE DATOS DE APLICACIÓN (37 CFR 1.76)

Título de la invención	Planta de piña llamada 'Rose' (EF2-114)
------------------------	---

Como el inventor mencionado a continuación, declaro que:

La declaración se ha dirigido a

☒ La aplicación adjunta o

☐ No. de aplicación _____ sometida _____,

☐ y las enmiendas realizadas el _____ (si aplica);

Yo/nosotros considero/consideramos que soy/somos el/los inventor(es) originales y primeros de la variedad nueva y distinta de la planta mencionada y para la cual se está buscando una patente de planta;

Yo/nosotros he/hemos reproducido la planta de esta aplicación de manera asexual;

☐ La planta se encontró en un área cultivada (marcar esta caja para una planta nueva encontrada);

Yo/nosotros he/hemos revisado y comprendo/comprendemos los contenidos de la aplicación identificada anteriormente, incluyendo las declaraciones, con las enmiendas específicas a lo mencionado anteriormente;

Yo/nosotros reconozco/reconocemos la responsabilidad de revelar toda la información de patentabilidad conocida por mí / nosotros a la oficina de patentes y marcas comerciales de los Estados Unidos de acuerdo con la definición en 37 CFR 1.56, incluyendo las aplicaciones de continuación, información material que se haya descubierto entre la fecha de sometimiento de la aplicación anterior y la fecha de sometimiento internacional PCT o nacional de la continuación en parte. La aplicación identificada anteriormente se hizo o fue autorizada por mí / nosotros

ADVERTENCIAS:

Se advierte al solicitante / aplicante evitar someter información personal en documentos sometidos en una aplicación de patente que puedan contribuir a suplantación de identidad. La información personal como los números de seguridad social, número de cuentas bancarias o números de tarjeta de crédito (fuera de una autorización de cheque o de tarjeta de crédito PTO-2038 sometida para el pago) nunca es solicitada por la USPTO para respaldar una petición o aplicación. Si este tipo de información personal se ha incluido en los documentos sometidos a la USPTO, los solicitantes / aplicantes deben considerar la redacción de esta información personal de los documentos antes de someterlos a la USPTO. Se le indica al solicitante / aplicante que el archivo de una aplicación de patente está disponible para el público luego de la publicación de la aplicación (a menos de que haya una solicitud de no-publicación de acuerdo con 37 CFR 1.213(a) en la aplicación) o la emisión de una patente. Adicionalmente, el registro de una aplicación abandonada también podría estar disponible al público si la aplicación se ha referenciado en una aplicación publicada o en una patente otorgada (ver 37 CFR 1.14). Los cheques y los formularios de autorización de tarjetas de crédito PTO-2038 sometidos para pagos no se han retenido en el archivo de la aplicación y por ende, no están disponibles al público.

Todas las declaraciones en esta aplicación sobre mi/nuestros conocimientos son verdaderas, todas las declaraciones se hacen aquí con respecto a información y se consideran como verdaderas y adicionalmente, estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento de las declaraciones falsas y las situaciones similares son penables con multas o prisión, o ambas, bajo 18 U.S.C. 1001, y podrían poner el peligro la validez de la aplicación o cualquier otorgamiento de patentes.

NOMBRE COMPLETO DE EL/LOS INVENTOR(ES)

Inventor uno: Ebrahim Firoozabady Fecha: 6/4/12

Firma: Original Firmado Ilegible Ciudadano de: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

☒ Inventores adicionales o representantes legales se mencionan en _____ formulario(s) adicional(es) mencionado(s) aquí.

Esta recolección de información es necesaria de acuerdo con 37 CFR 1.53(f). La información es necesaria para obtener o retener un beneficio del público que es someter (para que la USPTO procese) una aplicación. Confidencialmente está regido por 35 U.S.C. 122 y 37 CFR 1.11 y 1.14. Se estima que esta recolección de datos debe tardar 12 minutos para ser completada, incluyendo la obtención, preparación y el sometimiento del formulario de aplicación completo del USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual. Cualquier comentario sobre la cantidad de tiempo necesaria para completar este formulario y/o las sugerencias para reducir esta carga deben enviarse al Oficial Principal de Información, Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos, Departamento de Comercio de los Estados Unidos, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. 00 NO ENVIAR TARIFAS O FORMULARIOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCIÓN. ENVIAR A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Si usted necesita ayuda para completar el formulario, llamar al 1-800-PTO-9199 y seleccionar la opción 2.

DECLARACIÓN – Aplicación de patentes de plantas

Enviar toda la correspondencia a: 0		☐ La dirección relacionada con el número de cliente:			
		☐ Dirección de correspondencia a continuación			
Nombre					
Dirección					
Dirección					
Ciudad		Estado		Código postal	
País		Teléfono		Email	
ADVERTENCIAS: Se advierte al solicitante / aplicante evitar someter información personal en documentos sometidos en una aplicación de patente que puedan contribuir a suplantación de identidad. La información personal como los números de seguridad social, número de cuentas bancarias o números de tarjeta de crédito (fuera de una autorización de cheque o de tarjeta de crédito PTO-2038 sometida para el pago) nunca es solicitada por la USPTO para respaldar una petición o aplicación. Si este tipo de información personal se ha incluido en los documentos sometidos a la USPTO, los solicitantes / aplicantes deben considerar la redacción de esta información personal de los documentos antes de someterlos a la USPTO. Se le indica al solicitante / aplicante que el archivo de una aplicación de patente está disponible para el público luego de la publicación de la aplicación (a menos de que haya una solicitud de no-publicación de acuerdo con 37 CFR 1.213(a) en la aplicación) o la emisión de una patente. Adicionalmente, el registro de una aplicación abandonada también podría estar disponible al público si la aplicación se ha referenciado en una aplicación publicada o en una patente otorgada (ver 37 CFR 1.14). Los cheques y los formularios de autorización de tarjetas de crédito PTO-2038 sometidos para pagos no se han retenido en el archivo de la aplicación y por ende, no están disponibles al público. Todas las declaraciones en esta aplicación sobre mi/nuestros conocimientos son verdaderas, todas las declaraciones se hacen aquí con respecto a información y se consideran como verdaderas y adicionalmente, estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento de las declaraciones falsas y las situaciones similares son penables con multas o prisión, o ambas, bajo 18 U.S.C. 1001, y podrían poner el peligro la validez de la aplicación o cualquier otorgamiento de patentes.					
NOMBRE DEL ÚNICO INVENTOR O DEL PRIMER INVENTOR:			☐ Se ha sometido una petición para este inventor		
Nombre Ebrahim		Apellido Firoozabady			
Firma del inventor Original Firmado Ilegible		Fecha 6/4/12			
Residencia: Ciudad Pleasant Hill	Estado CA	País EUA	Ciudadanía Ciudadano de los EUA		
Dirección de correspondencia 3009 Shetland Dr					
Dirección de correspondencia					
Ciudad Pleasant Hill	Estado CA	Zip 94523	País EUA		
☐ Los inventores adicionales o los representantes legales se mencionan en las _____ hojas suplementales PTO/SB/02A o 02LR adjuntas aquí.					

DECLARACIÓN (37 CFR 1.63) PARA APLICACIÓN DE PLANTAS UTILIZANDO LA PLANTILLA DE DATOS DE APLICACIÓN (37 CFR 1.76)

Título de la invención	Planta de piña llamada 'Rose' (EF2-114)
------------------------	---

Como el inventor mencionado a continuación, declaro que:

La declaración se ha dirigido a

☒ La aplicación adjunta o

☐ No. de aplicación _____ sometida _____,

☐ y las enmiendas realizadas el _____ (si aplica);

Yo/nosotros considero/consideramos que soy/somos el/los inventor(es) originales y primeros de la variedad nueva y distinta de la planta mencionada y para la cual se está buscando una patente de planta;

Yo/nosotros he/hemos reproducido la planta de esta aplicación de manera asexual;

☐ La planta se encontró en un área cultivada (marcar esta caja para una planta nueva encontrada);

Yo/nosotros he/hemos revisado y comprendo/comprendemos los contenidos de la aplicación identificada anteriormente, incluyendo las declaraciones, con las enmiendas específicas a lo mencionado anteriormente;

Yo/nosotros reconozco/reconocemos la responsabilidad de revelar toda la información de patentabilidad conocida por mí / nosotros a la oficina de patentes y marcas comerciales de los Estados Unidos de acuerdo con la definición en 37 CFR 1.56, incluyendo las aplicaciones de continuación, información material que se haya descubierto entre la fecha de sometimiento de la aplicación anterior y la fecha de sometimiento internacional PCT o nacional de la continuación en parte. La aplicación identificada anteriormente se hizo o fue autorizada por mí / nosotros

ADVERTENCIAS:

Se advierte al solicitante / aplicante evitar someter información personal en documentos sometidos en una aplicación de patente que puedan contribuir a suplantación de identidad. La información personal como los números de seguridad social, número de cuentas bancarias o números de tarjeta de crédito (fuera de una autorización de cheque o de tarjeta de crédito PTO-2038 sometida para el pago) nunca es solicitada por la USPTO para respaldar una petición o aplicación. Si este tipo de información personal se ha incluido en los documentos sometidos a la USPTO, los solicitantes / aplicantes deben considerar la redacción de esta información personal de los documentos antes de someterlos a la USPTO. Se le indica al solicitante / aplicante que el archivo de una aplicación de patente está disponible para el público luego de la publicación de la aplicación (a menos de que haya una solicitud de no-publicación de acuerdo con 37 CFR 1.213(a) en la aplicación) o la emisión de una patente. Adicionalmente, el registro de una aplicación abandonada también podría estar disponible al público si la aplicación se ha referenciado en una aplicación publicada o en una patente otorgada (ver 37 CFR 1.14). Los cheques y los formularios de autorización de tarjetas de crédito PTO-2038 sometidos para pagos no se han retenido en el archivo de la aplicación y por ende, no están disponibles al público.

Todas las declaraciones en esta aplicación sobre mi/nuestros conocimientos son verdaderas, todas las declaraciones se hacen aquí con respecto a información y se consideran como verdaderas y adicionalmente, estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento de las declaraciones falsas y las situaciones similares son penables con multas o prisión, o ambas, bajo 18 U.S.C. 1001, y podrían poner el peligro la validez de la aplicación o cualquier otorgamiento de patentes.

NOMBRE COMPLETO DE EL/LOS INVENTOR(ES)

Inventor dos: Thomas R Young Fecha: 4 de junio de 2011

Firma: Original Firmado Ilegible Ciudadano de: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

☒ Inventores adicionales o representantes legales se mencionan en _____ formulario(s) adicional(es) mencionado(s) aquí.

Esta recolección de información es necesaria de acuerdo con 37 U.S.C. 115 y 37 CFR 1.63. La información es necesaria para obtener o retener un beneficio del público que es someter (para que la USPTO procese) una aplicación. Confidencialmente está regido por 35 U.S.C. 122 y 37 CFR 1.11 y 1.14. Se estima que esta recolección de datos debe tardar 12 minutos para ser completada, incluyendo la obtención, preparación y el sometimiento del formulario de aplicación completo del USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual. Cualquier comentario sobre la cantidad de tiempo necesaria para completar este formulario y/o las sugerencias para reducir esta carga deben enviarse al Oficial Principal de Información, Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos, Departamento de Comercio de los Estados Unidos, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. NO ENVIAR TARIFAS O FORMULARIOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCIÓN. ENVIAR A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Si usted necesita ayuda para completar el formulario, llamar al 1-800-PTO-9199 y seleccionar la opción 2.

Fig. 1. Las enzimas y los genes en la vía de la biosíntesis carotenoide de plantas y algas. (Adaptado de J. Hirschberg et al., Pure & Appl. Chem. 69(10): 2151-58). Se resaltan los genes usados en las transformaciones de la piña para crear el EF2-114.

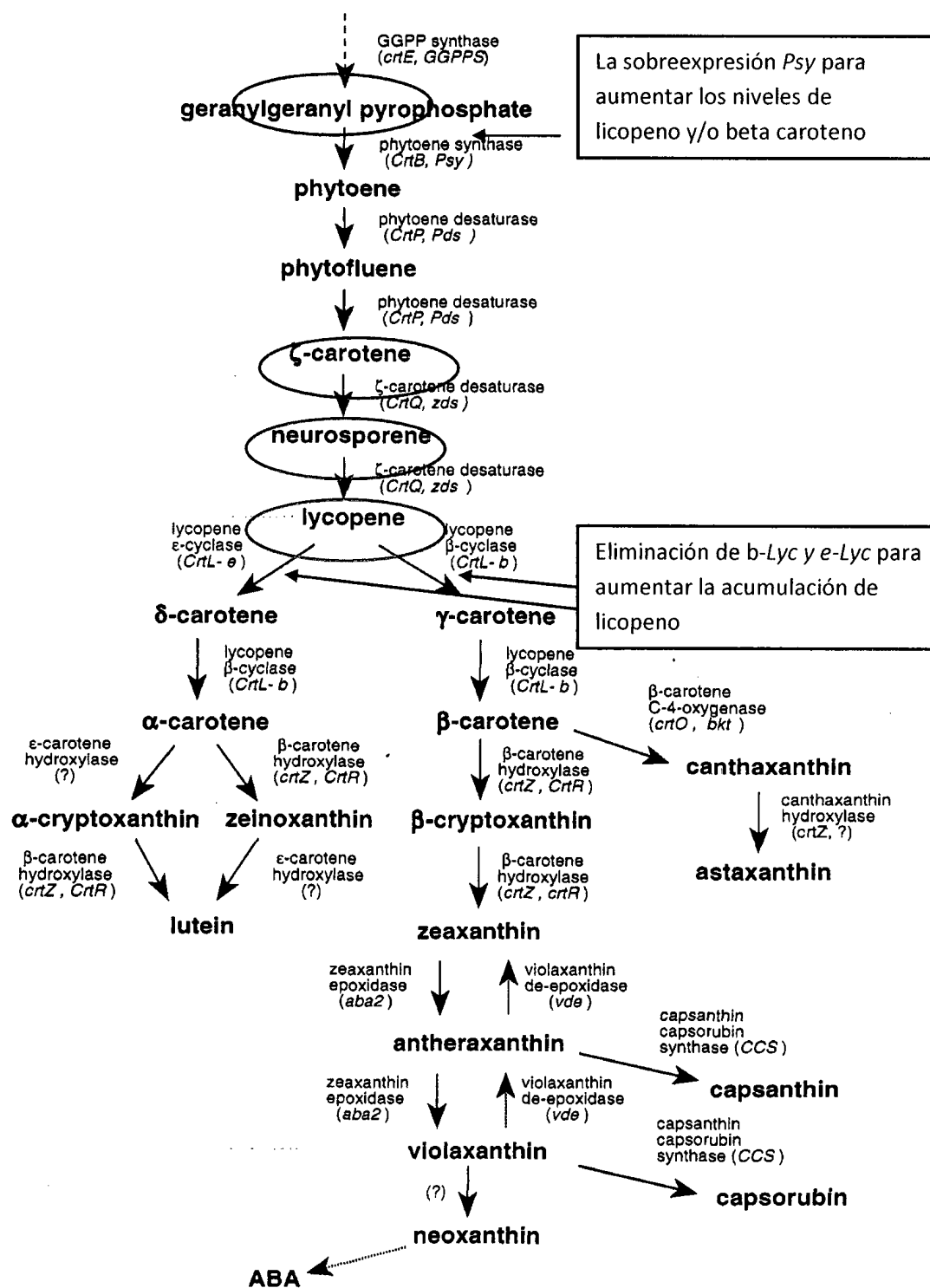


Fig. 2 – Vía de la biosíntesis de etileno en plantas

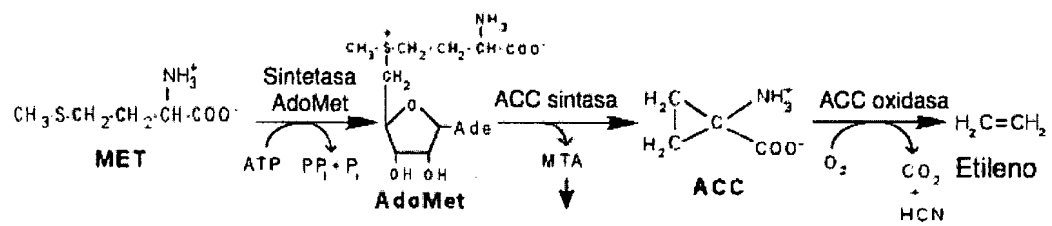


Fig. 3. El mapa del vector binario del plásmido, pHCW1, que se usa para la ingeniería genética de la piña.

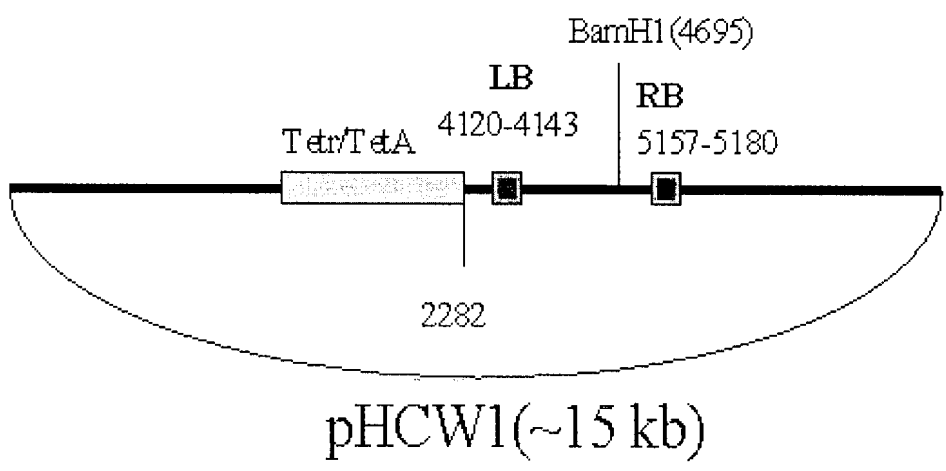


Fig. 4. El ADN-T en plásmido pHCW1 es la estructura común para crear el vector binario pHCW.T-7 (en AG76) y el vector binario pHCWflACC3'-2 (en AG62).

Diagrama Esquemático de la Región de ADN-T de AG76

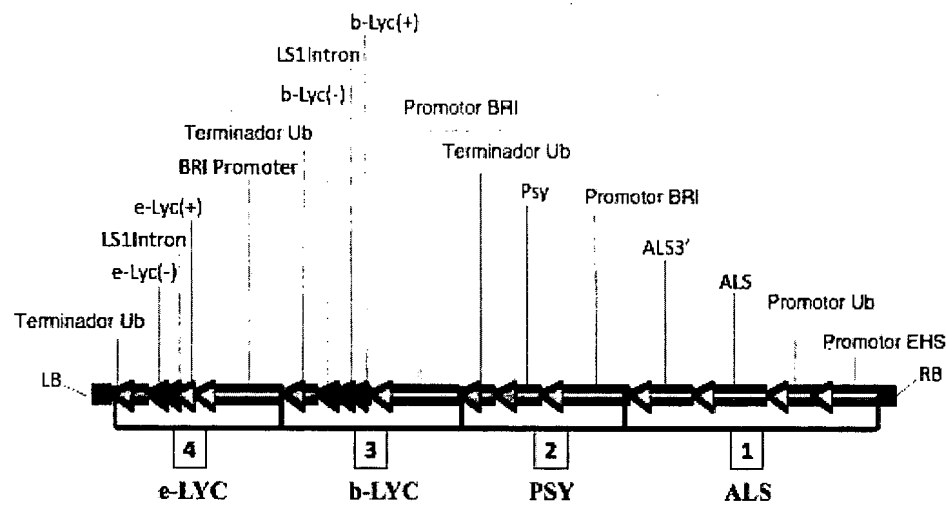


Diagrama Esquemático de la Región de ADN-T de AG62

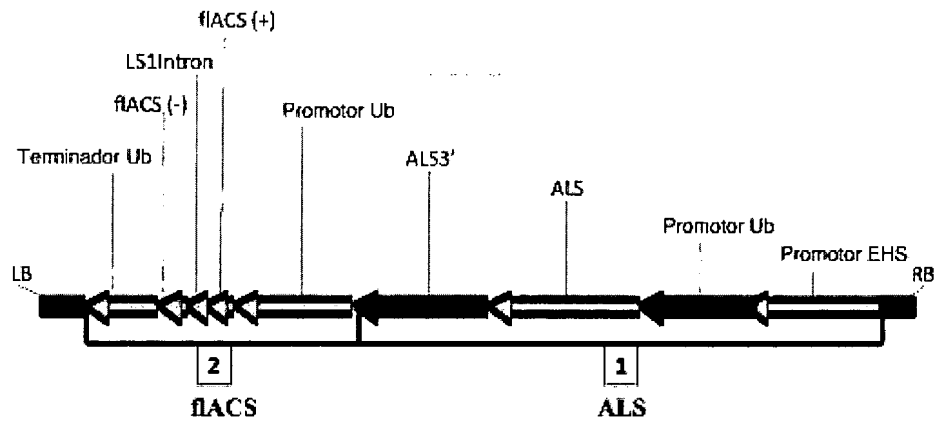


Fig. 5. Muestra del color interno de las frutas que va de rosa a rojo debido a la acumulación de licopeno.

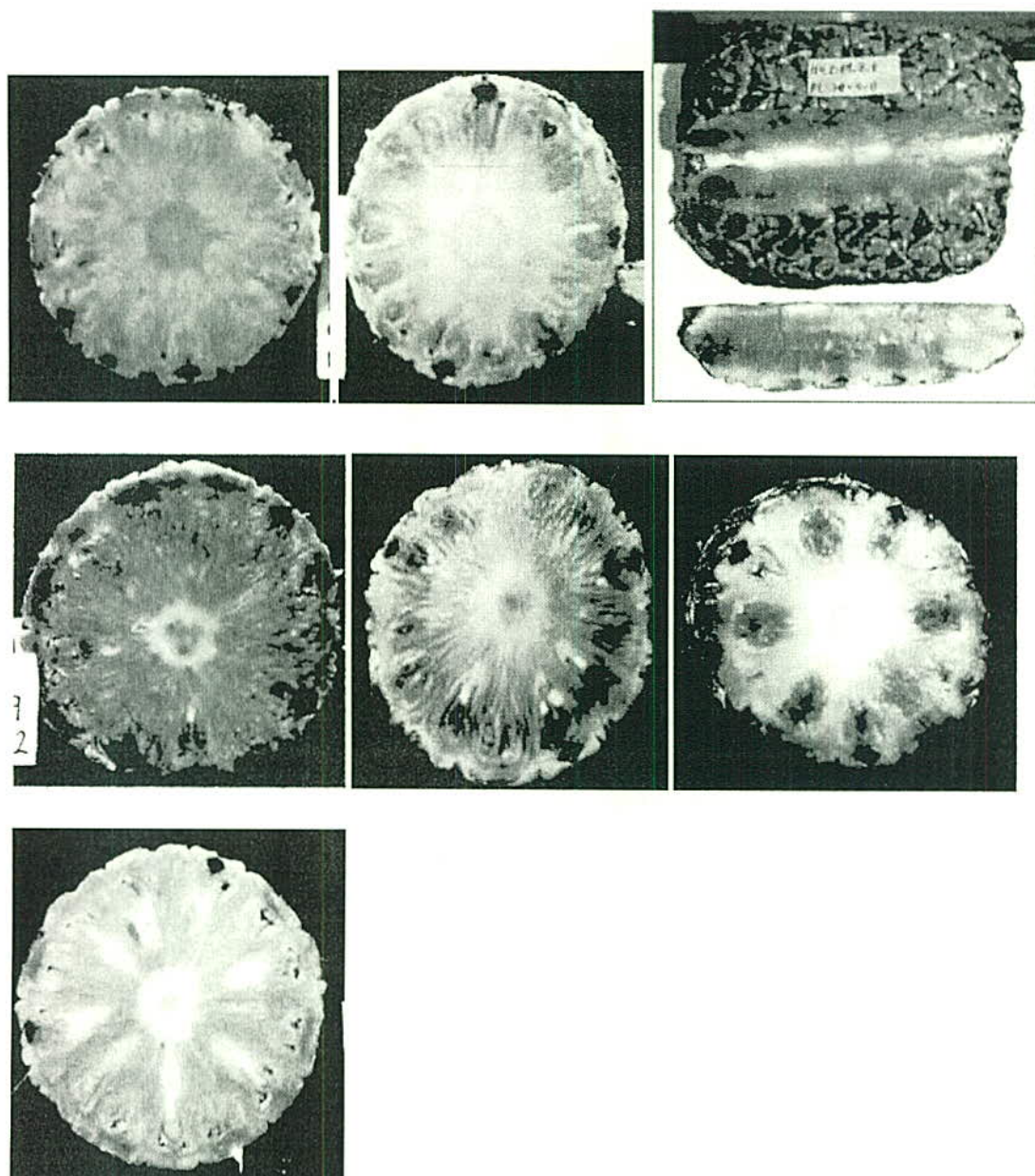


Fig. 6. Muestra del color de la cascara "Tigre" en las frutas EF2-114. El color de la cascara presenta una combinación de colores verde, amarillo, naranja (y rojo) en el hombro de cada fruto en desarrollo.

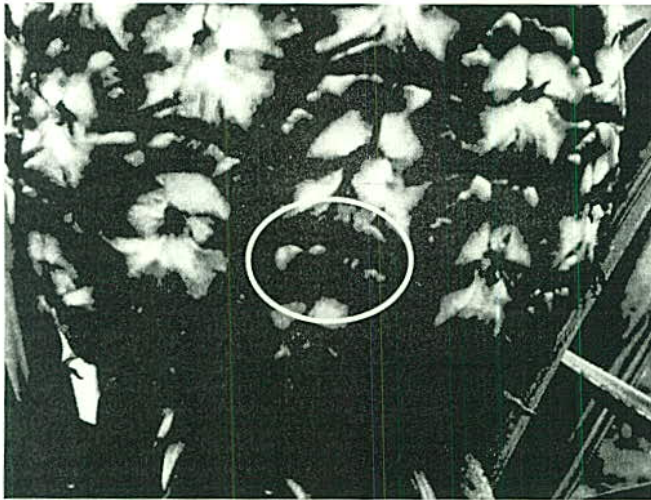
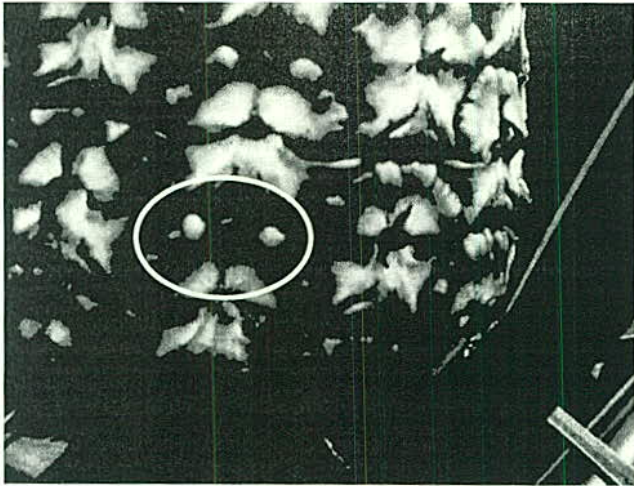
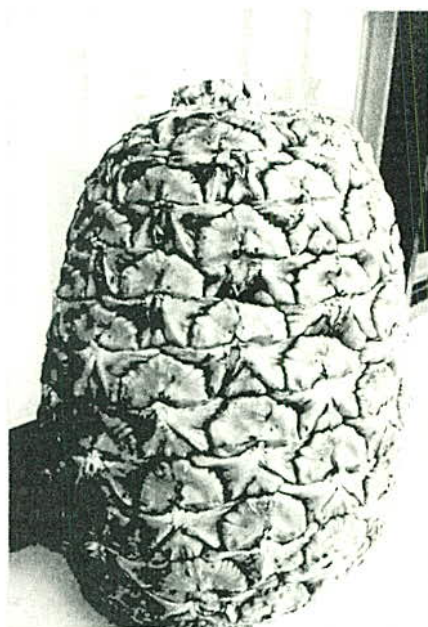


Fig. 7. Una fruta "Tigre" que muestra la cascara y el color interno al momento de su cosecha.

Área



Área a la

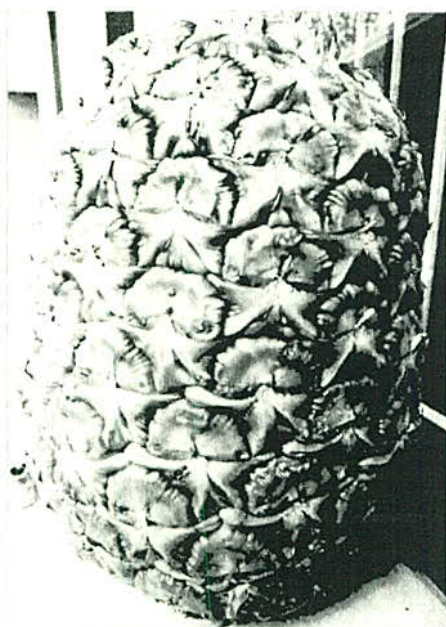


Fig 8. Muestra una fruta inmadura de 'Rosé' con morfología de la cáscara de Tigre (izquierda) y una fruta inmadura de MD2 (derecha) ambas ~145 días después de forzar su maduración.



Fig. 9. Muestra la vista desde arriba de una planta 'Rosé' EF2-114.

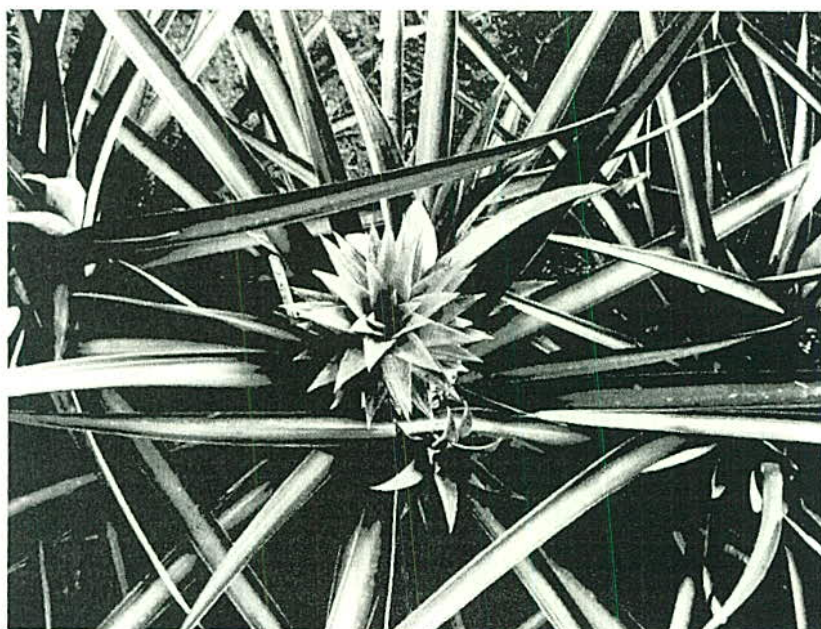


Fig. 10. Muestra una plantación de 'Rosé' EF2-114.



Fig 11: Muestra parcelas experimentales de EF2-114 (izquierda) y MD2 (derecha).



Fig 12: Muestra plantas EF2-114 (izquierda) y MD2 (derecha) derivadas del cultivo de meristemo. Después de 15 semanas de crecimiento en vivero, las plantas de ~15 cm de largo se trasplantan a macetas. Las fotos fueron tomadas 11 meses después.



HOJA DE DATOS DE LA SOLICITUD

INFORMACIÓN DE LA SOLICITUD

Tipo de solicitud:	Solicitud para Patente de Planta
Asunto:	Planta
Clasificación sugerida:	
Grupo de Unidad de Arte Sugerido:	
CD-ROM:	no
¿Secuencia de Presentación?:	no
Título:	Planta de Piña llamada Rosé (EF2-114)
Número de Expediente del Abogado:	Del Monte Rosé
¿Solicitud para Publicación Temprana?:	No
¿Solicitud para la No-Publicación?:	No
¿Entidad pequeña?:	Si
¿Petición incluida?:	No

INFORMACIÓN DE LA SOLICITUD

Tipo de Autoridad del Solicitante:	Inventor
Ciudadanía Principal:	EUA
Nombre Suministrado:	Ebrahim
Apellido:	Firoozbady
Ciudad de Residencia:	Coral Gables
Estado de Residencia:	Florida
Dirección postal por calle:	241 Sevilla Ave
Ciudad de la dirección postal:	Coral Gables
Estado de la dirección postal:	Florida
Código postal de la dirección postal:	33134

Del Monte – Plant Patent – Pineapple Rose

Tipo de Autoridad del Solicitante: Inventor
Ciudadanía Principal: EUA
Nombre Suministrado: Thomas
Apellido: YOUNG
Ciudad de residencia: Coral Gables
Estado de Residencia: Florida
Dirección postal por calle: 241 Sevilla Ave
Ciudad de la dirección postal: Coral Gables
Estado de la dirección postal: Florida
Código postal de la dirección postal: 33134

INFORMACIÓN DEL REPRESENTANTE

Designación del representante::	Número de registro::	Nombre del representante::
Principal	45533	John Dodds

INFORMACIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA

Nombre: John Dodds
Dirección postal por calle: 1707 N St. NW
Ciudad de la dirección postal: Washington
Estado o provincia postal: D.C.
Código postal: 20036
Número telefónico: 202-463 3275
Número de Fax: 202-463 3278
Correo Electrónico: j.dodds@doddsassociates.com

20

Del Monte – Plant Patent – Pineapple Rose

INFORMACIÓN DEL REPRESENTANTE LEGAL:
NOMBRE: **Del Monte Fresh Produce Company** 241 Sevilla Ave., Coral Gables, FL 33134

CONDICIÓN DE PEQUEÑA ENTIDAD: SÍ

4 DE Junio, 2012

DODDS Y ASOCIADOS

Por:

John Dodds