

Señores

Superintendencia de Industria y Comercio

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-116147- -00014-0000

Fecha: 2015-05-20 11:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 72

Ref: Expediente No. 13-116147

**Solicitud de registro de patente de invención denominada
"PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE
PIÑA LLAMADA ROSÉ"**

Solicitante: DEL MONTE FRESH PRODUCE.

Ana María Ruiz Rueda, identificada como aparece al pie de mi firma, y obrando en mi condición de apoderada de **DEL MONTE FRESH PRODUCE**, solicitante de la patente en referencia, a continuación me permito suministrar como complemento al Recurso de Reposición contra la Resolución No. 11333 del 13 de marzo de 2015, bajo el radicado No. 13-116147- -00013-0000, la traducción al Español del adjunto nombrado "*Documento que muestra más claramente al Examinador el proceso de creación de la planta, y sustenta la invención y el desarrollo inventivo del solicitante*".

En vista de lo anterior, se solicita amablemente que la traducción sea tenida en cuenta como fuente adicional de información para reafirmar la Novedad/Altura Inventiva de la solicitud.

Atentamente,


Ana María Ruiz Rueda

C.C 39.790.288 de Bogotá.

T.P. 84909 C.S.J.

ABM

P-713



Caracterización molecular del evento EF2-114 verifica la integridad y la estabilidad del ADN insertado

El evento EF2-114 es transformado por el co/cultivo con dos cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90) con vectores binarios, pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2. El plásmido pHCW.T-7 contiene tres transgenes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, lo que produce una fruta de color rosado / rojo debido a la acumulación de licopeno endógeno. El *PSY* codifica la fitoeno sintasa, la cual cataliza la conversión de pirofosfato de geranilo a fitoeno, un intermediario en la biosíntesis de licopeno. Los transgenes *bLcy* y *eLcy* suprimen el licopeno β -ciclase y la ϵ -ciclase endógenas por medio de un mecanismo mediado por iARN, lo que produce la acumulación de licopeno en tejidos comestibles de la fruta. El plásmido pHCWflACC3'-2 contiene un transgen de iARN *flACC3'* para suprimir la sintasa ACC (ACS por sus siglas en inglés) endógena, la cual está involucrada en la biosíntesis del etileno. La ACS codifica la enzima sintasa aminociclopropano-1-ácido, lo que cataliza el paso de limitación de tasa en la biosíntesis del etileno. La supresión del etileno endógeno sirve para promover la floración y la producción de frutas uniformes. Ambos plásmidos también contienen el transgen *SuRBHra*, lo que codifica un acetolactato sintasa utilizada únicamente como un marcador seleccionable durante el desarrollo.

Los análisis moleculares demostraron que el evento EF2-114 tiene un patrón de integración de T-ADN(s) con una copia intacta de pHCW.T-7 T-ADN y una copia truncada del pHCWflACC3'-2 T-ADN insertado en el genoma de la piña. No se detectaron secuencias de backbone de pHCW.T-7 o pHCWflACC3'-2 en el genoma del Evento EF2-114.

1. DESCRIPCIÓN DEL EVENTO EF2-114

Esta sección presenta una descripción del Evento EF2-114 el cual se ha presentado para la valoración de seguridad alimenticia y nutricional. La descripción identifica la cosecha, el evento de transformación que se va a analizar y el tipo y el propósito de la modificación, lo que ayudará a comprender la naturaleza de los productos alimenticios que pueden ser desarrollados a través del Evento EF2-114. La información que se presenta en esta sección también se refiere a lineamientos del Códex de Plantas, Sección 4, párrafo 22.

I.A. DESIGNACIÓN DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN

De acuerdo con el "Lineamiento para la Designación de un Identificador Único para Plantas Transgénicas," de la OECD, al Evento EF2-114 se le asignó el identificador único FDP-ØØ114-5.

I.B. TIPO Y PROPÓSITO DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

El Evento EF2-114 contiene tres transgenes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, los cuales producen frutas de color rosado/rojo debido a una acumulación del licopeno endógeno. El *PSY* codifica la enzima fitoeno sintasa (EC 2.5.1.32), lo que cataliza la conversión del pirofosfato de genarilo a fitoeno, un intermediario en la biosíntesis de licopeno. Los transgenes *bLcy* y *eLcy* suprimen el licopeno β -ciclasa (EC 5.5.1.19) y la ϵ -ciclasa (EC 5.5.1.18) utilizando la tecnología de interferencia de ARN (iARN) para acumular el licopeno en los tejidos comestibles de la fruta.

El Evento EF2-114 también contiene un transgen iARN *fACC3'* para suprimir el ACS endógeno involucrado en la biosíntesis del etileno. La ACS (EC 4.4.1.14) cataliza el paso de limitación de tasa en la biosíntesis del etileno. La supresión del etileno endógeno se utiliza para promover la floración y la producción de frutas uniformes.

El Evento EF2-114 también contiene el transgen *SuRBHra* que codifica una sintasa de acetolactato modificada (EC 2.2.1.6) utilizada exclusivamente como un marcador seleccionable durante el desarrollo.

I.C. DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES GENÉTICOS INTRODUCIDOS EN EL EVENTO EF2-114

En la Sección IV se describe con mayor detalle el material genético que se introdujo en el Evento EF2-114.

I.C.1. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA RECEPTORA

La variedad de piña utilizada como receptora de la inserción de ADN para crear el Evento EF2-114 es la MD2, una variedad convencional no-transgénica por parte del Instituto de Investigación de la Piña [Pineapple Research Institute (PRI)] y liberada al mercado por Del Monte Fresh Produce durante los años ochenta utilizando el nombre comercial de Piña Extra Dulce Del Monte Gold® [Del Monte Gold® Extra Sweet Pineapple].

La MD2 fue desarrollada para el mercado de frutas frescas utilizando fitotecnia convencional de un cruce entre los híbridos PRI 58-1184 y 59-443. La MD2 produce una fruta de forma cilíndrica mediana a grande (1.3-2.5 kg) con ojos planos grandes y un color anaranjado-amarillo intenso. La pulpa amarilla es dulce, compacta y fibrosa. Tiene un alto contenido de azúcar (14-17% Brix) y ácido ascórbico, pero tiene un menor contenido de ácido total que la variedad de piña *Smooth Cayenne*. El centro de la piña es suave, comestible y más delgado que el de la piña *Smooth Cayenne*. Sin embargo, la corona puede ser más grande y ocasionalmente el extremo distal es removido durante su cosecha. Las hojas son verdes y prácticamente no tienen espinas. La MD2

es más productiva que la piña *Smooth Cayene*. Es más resistente al pardeamiento interno, pero es susceptible a que se pudra su centro y más sensible a *Fitoflora* que la piña *Smooth Cayenne*. La morfología de la piña MD2 se describe en el Anexo I.

I.C.2. ANANAS COMOSUS

Las secuencias de codificación parcial *bLcy*, *eLcy*, y *fIACC3'* se han derivado de la piña (*A. comosus*) cultivada en Costa Rica y fueron aisladas por Wintz y Firoozabady (2011). La taxonomía de la piña es (USDA NRCS, 2012):

Reino	Plantae – Plantas
Subreino	Tracheobionta – Plantas vasculares
Súper-división	Spermatophyta – Plantas de semillas
División	Magnoliophyta – Plantas de floración
Clase	Liliopsida – Monocotiledoneas
Sub-clase	Zingiberidae
Orden	Bromeliales
Familia	Bromeliaceae – Familia de las bromelias
Género	<i>Ananas</i> Mill. – Piña
Especies	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. – Piña

La piña tiene amplios antecedentes de uso seguro como un alimento para humanos y no es un alérgeno alimenticio importante ni una fuente de toxinas en la dieta (ver la Sección II.C.2).

Los genes *bLcy* y *eLcy* de largo completo codifican el licopeno β -ciclaza y el licopeno ϵ -ciclaza, los cuales catalizan la ciclización del licopeno en β -caroteno y la luteína, respectivamente (Hirschberg, 2001). Únicamente se introdujeron secuencias de codificación parciales de *bLcy* y *eLcy* en el Evento EF2-114 como un constructo de iARN horquillado para obtener una supresión endógena del gen. El gen ACS de largo completo codifica la enzima sintasa de aminociclopropano-1-ácido carboxílico (EC 4.4.1.14), la cual cataliza el paso de limitación de tasa en la biosíntesis del etileno. Únicamente se introdujo una porción del *fIACC3'* en el Evento EF2-114 como un constructo de iARN horquillado para lograr la supresión de un gen. Adicionalmente, no se predice la expresión de los genes de piña introducidos.

I.D. IDENTIDAD Y FUENTE DEL MATERIAL GENÉTICO INTRODUCIDO EN EL EVENTO EF2-114

El Evento EF2-114 fue producido por la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando dos plásmidos binarios pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2. Excepto por las secuencias del límite derecho (RB por sus siglas en inglés) y del límite izquierdo (LB por sus siglas en inglés), todos los elementos genéticos presentes en ambos T-ADNs¹ (las secuencias de codificación y regulatorias) son obtenidos en plantas: mandarina, piña o tabaco. La clonación de los elementos genéticos individuales en cada cassette y el ensamble de los cassettes se realizó utilizando técnicas de biología molecular recombinante (Maniatis et al., 1982; Sambrook and Russell, 2001). La secuencia de nucleótidos del T-ADN en pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2 se confirmó por medio de secuencia de ADN (Elim Biopharmaceuticals, Inc., Hayward, CA; los datos no se incluyen).

No hay evidencia de ninguna situación de seguridad asociada al uso del Evento EF2-114 y no hay evidencia de toxicidad para humanos o animales por parte de ninguna de las secuencias de ADN codificadas y no codificadas que están presentes en el Evento EF2-114. El ADN siempre ha estado presente en los alimentos y cuando es consumido es rápidamente degradado a ácidos nucleicos por las nucleasas de restricción que están presentes en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales. De acuerdo con la FDA estadounidense (U.S. FDA, 1992), los ácidos nucleicos están presentes en las células de todos los organismos vivos, no representan una preocupación cuando están presentes como componentes de los alimentos y generalmente han sido reconocidos como seguros. Los resultados del taller del International Life Sciences Institute (ILSI) sobre las consideraciones de seguridad del ADN en alimentos han sido reportados (Jonas, et al., 2001) y confirmó que: 1) todo el ADN, incluyendo el ADN recombinante, está compuesto de los mismos cuatro nucleótidos; 2) no hubo cambios a las características o la susceptibilidad a la degradación por medio de la hidrólisis química o enzimática del ADN recombinante en comparación con el ADN no-recombinante; y 3) no hay evidencia de que el ADN de las fuentes alimenticias haya sido incorporado al genoma mamífero. Adicionalmente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia (EFSA por sus siglas en inglés) ha reportado que una gran cantidad de estudios experimentales ha demostrado que el ADN recombinante consumido por el ganado no se ha detectado posteriormente en la pulpa, los fluidos o los productos comestibles de estos animales de granja (EFSA, 2007).

I.E. REFERENCIAS

¹ T-AND se refiere al ADN que se transfiere al genoma nuclear de la piña durante la transformación.

- Dawson RF, Christman DR, D'Adamo A, Solt ML and Wolf AP. 1960. The biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotinic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 82(10): 2628–2633.
- Ebo DG, Ahrazem O, Lopez-Torrejon G, Bridts CH, Salcedo G and Stevens WJ. 2007. Anaphylaxis from mandarin (*Citrus reticulata*): identification of potential responsible allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144(1):39-43.
- EFSA. 2007. EFSA statement on the fate of recombinant ADN or proteins in meat, milk and eggs from animals fed with GM feed. European Food Safety Authority, Parma, Italy.
- Hanelt P. 2001. Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals). P Hanelt and (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 1033.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(3):210-218.
- Hodgson RW. 1967. Horticultural varieties of citrus. Chapter 4. In: The citrus industry. Reuther W, HJ Webber and LD Batchelor (eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.
- IFBC (International Food Biotechnology Council). 1990. Biotechnologies and food: Assuring the safety of foods produced by genetic modification. *Regul. Toxicol. Pharm.* 12, S1-S196.
- Iorio RA, Del Duca S, Calamelli E, Pula C, Lodolini M, Scamardella F, Pession A and Ricci G. 2013. Citrus allergy from pollen to clinical symptoms. *PloS One* 8(1):e53680. [10.1371/journal.pone.0053680](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053680).
- Jonas DA, Elmadfa I, Engel KH, Heller KJ, Kozianowski G, König A, Müller D, Narbonne JF, Wackernagel W and Kleiner J. 2001. Safety considerations of ADN in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45:1-20.
- Lamberts BL, Dewey LJ and Byerrum RU. 1959. Ornithine as a precursor for the pyrrolidine ring of nicotine. *Biochim. Biophys. Acta* 33(1):22-26.
- Lee KY, Townsend J, Tepperman J, Black M, Chui CF, Mazur B, Dunsmuir P and Bedbrook J. 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

- Misaki A. 1999. The origin and the development process of Kisyu Arida Mikan (Arida mandarin). [English abstract] *Wakayama Economic Review* 292:97-118.
- Sambrook J and Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Saville AC, Krings A, Kahn T, Trice MD and Redford AJ. 2011. *Citrus ID*, Edition 2. USDA APHIS PPQ CPHST, Fort Collins and North Carolina State University. <http://idtools.org/citrus/citrusid/> (accessed August 30, 2013).
- Shoji T and Hashimoto T. 2011. Nicotine biosynthesis. *In: Plant metabolism and biotechnology*. H Ashihara, A Crozier, A Komamine (eds.). Cambridge: Wiley. pp. 191-216.
- Swingle WT. 1943. The botany of citrus and its relatives of the orange sub-family. *In: Webber, H.J. and L.D. Batchelor (eds.). The citrus industry* 1:129-474. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.
- Tanaka T. 1927. Taxonomy of the citrus fruits of the Pacific region. *Mem. Tanaka Citrus Exper. Sta.* 1(1):15-36.
- Ullah MF and Khan MW. 2008. Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 9:187-196
- U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register*: 22984-23005.
- USDA ARS. 2013. *World Economic Plants* report from USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxeconlist.pl> (accessed September 25, 2013).
- USDA NRCS. 2012. The PLANTS database. <http://plants.usda.gov> (accessed August 29, 2013). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401 USA.
- WHO/IUIS. 2013. World Health Organization – International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee. Systematic allergen database. <http://allergen.org>. (accessed September 18, 2013).
- Wintz HC and Firoozabady E. 2011. Plant promoters, terminators, genes, vectors and related transformed plants. Australia Patent No. 2006236392. Pending in U.S. and EU (Patent publication no. 2006113709/WO-A2).

II. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

En esta sección se presenta una descripción del proceso de transformación y el vector de plásmido utilizado para el desarrollo del Evento EF2-114. Los análisis moleculares son una parte integral de la caracterización de los productos de cosecha con nuevos rasgos introducidos por medio de biotecnología. Los vectores y los métodos se seleccionan para la transformación para contar con una alta probabilidad de obtener el rasgo que se desea obtener y la integración del ADN introducido en el genoma de la planta. Esto ayuda a garantizar que únicamente se integren los rasgos que se desean integrar al genoma de la planta por medio de la codificación ADN y facilita la caracterización molecular del producto. La información que se presenta aquí permite la identificación del material genético presente en el vector de transformación que se administró a la planta huésped y para un análisis de los datos que respaldan la caracterización del ADN insertado en la planta el cual se presenta en la Sección V. La información que se presenta en esta sección también se refiere a los lineamientos del Códex de Plantas, Sección 4, párrafos 27, 28 y 29.

El Evento EF2-114 se desarrolló a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de los tejidos base de hojas de piña MD2 convencional utilizando los plásmidos de transformación pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2. Esta sección describe los efectos técnicos que se pretende introducir por medio de la modificación genética. También describe los vectores de plásmidos, los genes donadores y los elementos regulatorios utilizados para desarrollar el Evento EF2-114 y la secuencia de aminoácidos deducida para las proteínas expresadas en el Evento EF2-114. En esta sección, el ADN de transferencia (T-ADN) se refiere al ADN que se transfiere a la planta durante la transformación. Un cassette de expresión está compuesto por secuencias que se deben transcribir y los elementos regulatorios necesarios para la expresión de estas secuencias.

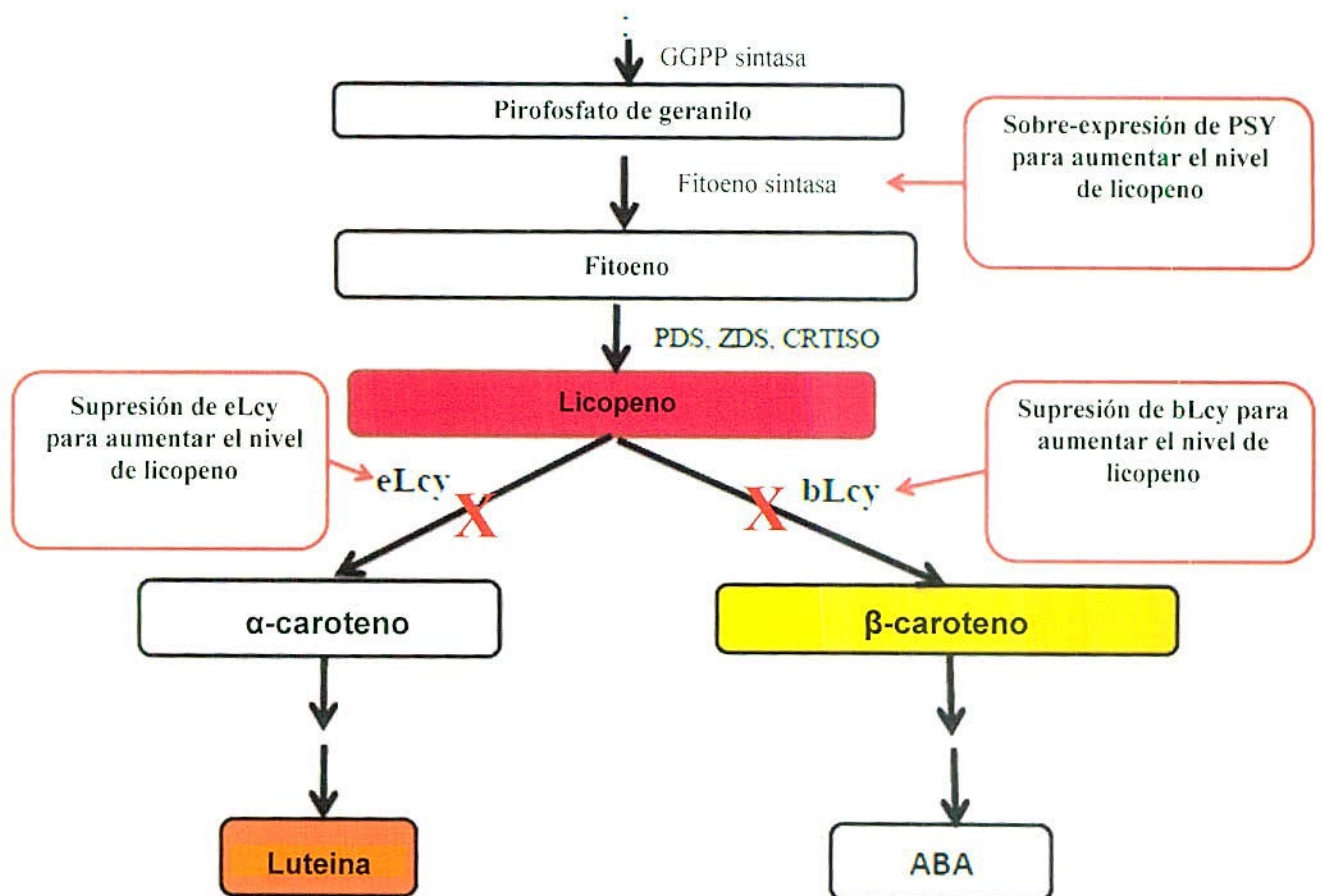
II.A. EFECTOS TÉCNICOS DEL EVENTO EF2-114

II.A.1. BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES

En las plantas, los carotenoides son componentes esenciales del aparato de fotosíntesis y son responsables del color rojo, anaranjado y amarillo de muchas flores y frutas. La comprensión de la biosíntesis de carotenoides ha avanzado dramáticamente durante los últimos años (Hirschberg, 2001; Fraser and Bramley, 2009) y su manipulación genética y el cuerpo de evidencia para los efectos sobre la salud han sido revisados recientemente (Fraser and Bramley, 2009). La vía involucra una serie de desaturaciones, ciclizaciones, hidroxilaciones y epoxidaciones iniciando con la formación de fitoeno (Ma et al., 2011). Una serie subsecuente de desaturaciones es responsable de la síntesis del licopeno. Luego de las reacciones de desaturación, la ciclización del licopeno es catalizada por dos enzimas, licopeno β -ciclase y ϵ -ciclase, lo que produce la formación de β -caroteno y α -caroteno, respectivamente (Cunnigham et al., 1996).

La Figura IV-1 ilustra la estrategia utilizada para la manipulación de la biosíntesis del carotenoide para lograr el desarrollo del Evento EF2-114. Del Monte Fresh Produce introdujo un gen de fitoeno sintasa (*PSY*) de una forma específica para frutas para aumentar la producción de licopeno. Del Monte Fresh Produce también suprimió los genes endógenos de licopeno de piña β -ciclase (*bLcy*) y ϵ -ciclase (*eLcy*) de una forma específica para frutas por medio de tecnología iARN (Ma et al., 2011; Watanabe, 2011; Hammond et al., 2001) para aumentar la acumulación de licopeno en la fruta de piña. La fuente, la identidad y la función de cada uno de los elementos genéticos se discute en la Tabla IV-1.

Figura II-1. Vía de biosíntesis de carotenoides



Las flechas sólidas representan los pasos de la reacción. Las siguientes enzimas y compuestos intermedios se han representado: GGPP sintasa: pirofosfato de geranilo sintasa: PSY: fitoeno

sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: ζ -caroteno desaturasa; CSTISO: isomerasa carotenoide;
eLcy: licopeno ϵ -ciclaza; bLcy: licopeno β -ciclaza; ABA: ácido abscísico.

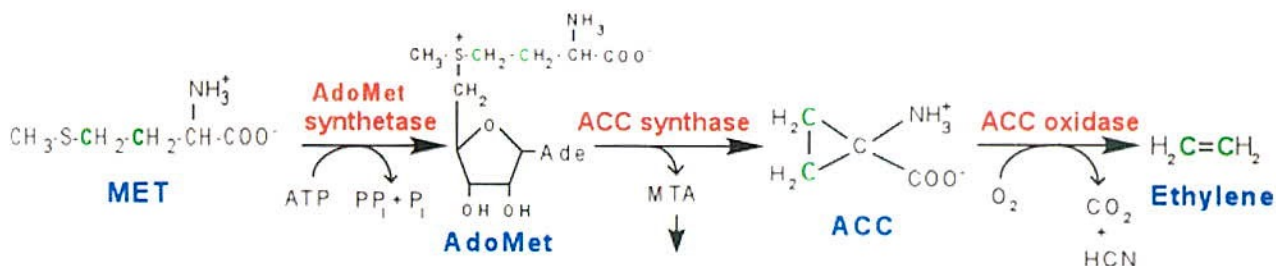
II.A.2. CONTROL DE FLORACIÓN

La fase reproductiva de la piña inicia en respuesta a la floración natural o la inducción forzada del desarrollo reproductivo por medio de un regulador de crecimiento (forzado). El florado natural es inducido por factores de cultivo (tamaño, peso y tipo de material de trasplante, tiempo de siembra, nutrientes) y ambientales (duración de día reducida, temperaturas moderadas, irradiación baja) (da Cunha, 2005) y puede ocurrir en el transcurso de muchos meses. La sincronización de la floración se ha mejorado dramáticamente a través de la inducción forzada utilizando reguladores de crecimiento de plantas como químicos productores de etileno (e.g., ethephon, auxin). A pesar de estas prácticas de producción, una fracción de la cosecha (5% hasta un 70% bajo algunas condiciones) florece de manera temprana, lo que provoca una perturbación de la programación de la cosecha así como del suministro del mercado, mayores costos de cosecha, mayor uso de pesticidas y pérdidas significativas asociadas a la cosecha.

El etileno es una hormona que se encuentra naturalmente en las plantas y que tiene un rol importante en cada fase del desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, la maduración de las frutas, la senescencia de las hojas y flores y la abscisión. A diferencia de otras plantas, el inicio de la flor de la piña es inducido por el etileno (Salisbury and Ross, 1992; Turnbull et al., 1993) y por ende, para reducir la floración precoz, Del Monte Fresh Produce introdujo un transgen creado para suprimir la biosíntesis del etileno.

En las plantas, el etileno es derivado del amino ácido metionina, el cual es convertido por la AdoMet sintetasa a S-adenosil-metionina (AdoMet) (Figura IV-2). El AdoMet sirve como el precursor en varias vías biosintéticas, incluyendo la producción de poliaminas. El ACS cataliza la conversión de AdoMet a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), el cual es el primer paso que se comete y en la mayor parte de los casos, el paso que limita la tasa en la biosíntesis del etileno (Adams and Yang, 1979; Wang et al., 2002).

Figura II-2. Ruta de biosíntesis del etileno



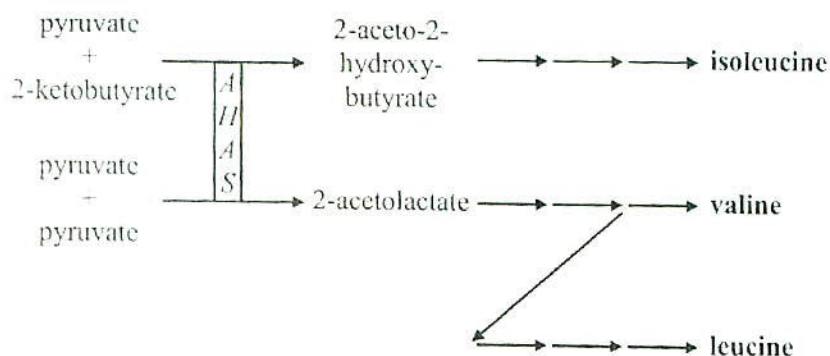
Las enzimas que catalizan cada paso se presentan de color rojo, los sustratos se presentan de color azul. MET: metionina; AdoMet: S-adenosil-metionina; MTA: metiltioadenina; ACC: 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (Wang et al., 2002).

Del Monte Fresh Produce aisló el gen meristem ACS (*flACC3'*) de la piña y construyó secuencias orientadas a secuencias sense (*flACC+*) y antisense (*flACC-*) del gen ACS (*flACC3'*), las cuales están separadas por un intron del gen LS1 de la papa (*Solanum tuberosum*) para formar una estructura horquillada. El constructo de iARN está bajo el control transcripcional del promotor de ubiquitina (Ubpp) de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). La fuente, identidad y función de cada uno de los elementos genéticos se describen en la Tabla IV-2.

II.A.3. MARCADOR SELECCIONABLE DE LA PLANTA

Los plásmidos de transformación también contienen un cassette de gen marcador seleccionable de la planta el cual está compuesto por un gen de sintasa acetolactato (*SuRBHra*) derivado del tabaco (*Nicotiana tabacum*) bajo el control transcripcional del promotor de la fusión EHS-Ubpp. Este promotor introduce una baja expresión del gen *SuRBHra* de manera consecutiva para permitir la selección de células transformadas del cultivo de tejidos. La expresión del gen *SuRBHra* produce células transformadas resistentes a las sulfonilureas. Las sulfonilureas son un grupo de compuestos que inhiben ALS (Ray, 1984), la enzima que cataliza el primer paso común en la biosíntesis de los amino ácidos de cadena ramificada isoleucina, leucina, y valina (Figura IV-3) (Lee and Duggleby, 2006).

Figura II-3. Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada isoleucina, leucina y valina



ALS (también conocida como la acetohidroxiácido sintasa, AHAS) cataliza la descarboxilación del piruvato seguida por un conjunto de reacciones que resultan en la producción de los aminoácidos.

Los genes de ALS están ampliamente disseminados en la naturaleza y los mismos están presentes en bacterias, hongos y todas las plantas. Diversos genes de ALS se han utilizado para la producción de cosechas resistentes a herbicidas (Mazur and Falco, 1989). SuRBHra es una enzima ALS en la cual la sustitución de dos aminoácidos del tipo wild hacen que la enzima sea

insensible a la inhibición por parte del clorsulfuron (Lee et al., 1988). Las células de plantas que expresan el gen *SuRBHra* tienen la capacidad de sintetizar los aminoácidos esenciales en presencia del clorsulfuron. El *SuRBHra* se utilizó como un marcador seleccionable durante el desarrollo del Evento EF2-114 y no tienen ningún propósito agronómico ni ningún propósito adicional en la planta.

II.B. VECTOR DE PLÁSMIDO pHCW.T-7

El Evento EF2-114 fue producido por la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando dos plásmidos pHCW.T-7 (Figura IV-4) y pHCWflACC3'-2 (Figura IV-6). El tamaño del plásmido de expresión pHCW.T-7 es de aproximadamente 36.6 kb.

Figura II-4. Mapa circular del pHCW.T-7

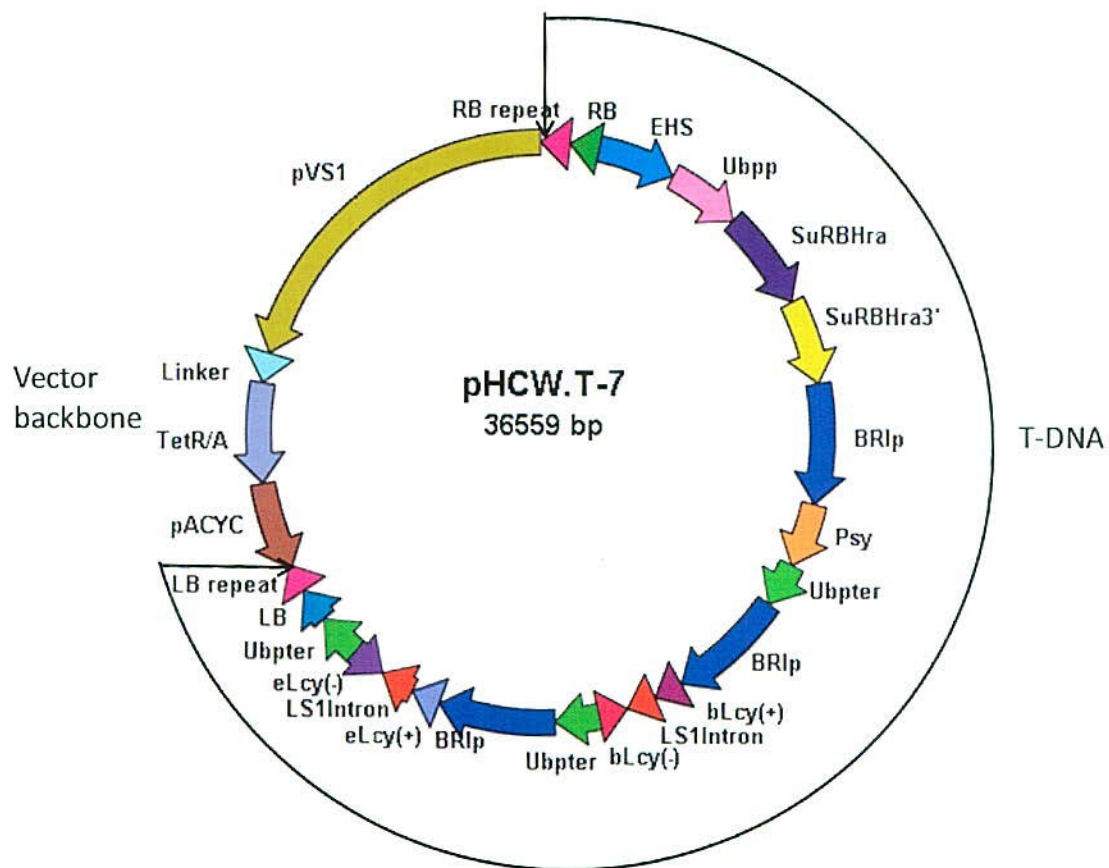
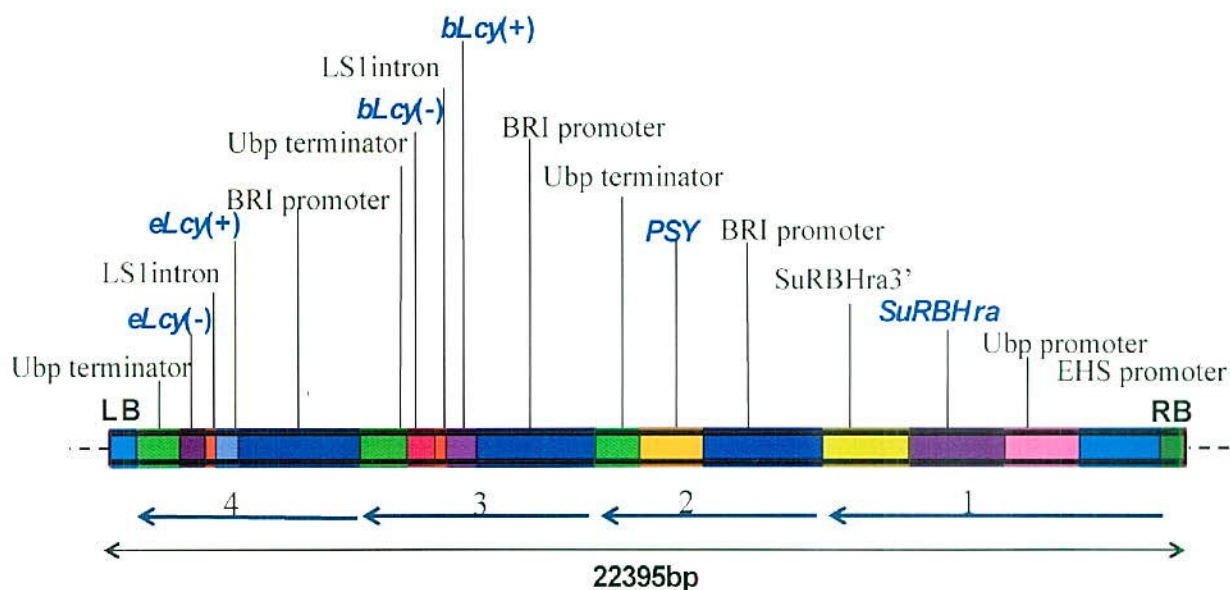


Figura II-5. Diagrama del T-ADN del pHCW.T-7



Las flechas con números (1-4) representan los cuatro cassettes de expresión y los elementos regulatorios respectivos en el pHCW.T-7.

II.B.1. ELEMENTOS GENÉTICOS DEL pHCW.T-7 T-ADN

Los 22.4 kb de T-ADN del plásmido pHCW.T-7 cuentan con cuatro cassettes de expresión. La organización y la orientación de los cuatro cassettes de expresión se presentan en la Figura IV-5 y se describen a continuación. El gen de interés de los cassettes de expresión individuales se presenta en texto de color azul. La ubicación de cada uno de los elementos genéticos en el T-ADN (posición del par base) y su tamaño se presentan en la Tabla IV-1.

- El cassette de expresión EHS-Ubpp-*SuRBHra*-*SuRBHra*3' (marcador seleccionable de planta) está compuesto de un promotor de fusión constitutivo EHS-Ubpp. El EHS-Ubpp es una fusión de la secuencia del promotor /5'UTR del gen de la epóxido hidrolasa (*EHS por sus siglas en inglés*) y el promotor /5'UTR del gen de la ubiquitina tetramérica (*Ubi*). Ambos promotores fueron aislados de la piña (*Ananas comosus*). La *SuRBHra* es un gen mutante de la sintasa de acetolactato (*ALS por sus siglas en inglés*) del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Lee et al., 1988). La *SuRBHra* es altamente resistente al herbicida clorsulfuron, razón por la cual fue seleccionado para las plantas de piña transformadas. La *SuRBHra*3' corresponde a la región no traducida 3' del gen de *ALS* del tabaco, el cual sirve como un terminador de transcripción. Los promotores fusionados demostraron estar fuertemente expresados en los tejidos de piña (Wintz and Firoozabady, 2011) y por ende, se utilizaron para expresar el gen para la selección con clorsulfuron.

- b) El cassette de expresión BRIp-*PSY*-Ubpter está compuesto por una secuencia promotora optimizada para fruta del gen *BRI* de la piña (*A. comosus*) (Moyle et al., 2005), la secuencia de codificación de tamaño completo del gen fitoeno sintasa (*PSY*) de la mandarina (*Citrus unshiu*) (Ikoma et al., 2001) y el 3' UTR/región de flanqueo del gen tetramérico *Ubi* de la piña (*A. comosus*) el cual sirve como un terminador de transcripción (Wintz and Firoozabady, 2011).
- c) El cassette de expresión BRIp-*bLcy* iARN-Ubpter está compuesto por la secuencia promotora optimizada para frutas del gen *BRI* de la piña (*A. comosus*) (Wintz and Firoozabady, 2011), una secuencia de codificación parcial del gen de licopeno β -ciclase (*bLcy*) de la piña (*A. comosus*) (Singh et al, 2003; Kim et al, no publicado; Pecker et al, 1996; Hugueney et al, 1995) en el sentido de la orientación, la secuencia intron 2 del gen *ST-LSI* de la papa (*Solanum tuberosum*) (Eckes et al., 1986), una secuencia de codificación parcial del gen de licopeno β -ciclase (*bLcy*) de la piña (*A. comosus*) en la orientación anti-sense y una secuencia de término correspondiente a 3' UTR/región de flanqueo del gen tetramérico *Ubi* de la piña (*A. comosus*) (Wintz and Firoozabady, 2011).
- d) El cassette de expresión BRIp-*eLcy* iARN-Ubpter es idéntico al BRIp-*bLcy* iARN-Ubpter excepto que la porción de iARN *bLcy* se ha reemplazado con la secuencia de codificación parcial del gen de licopeno ϵ -ciclase (*eLcy*) de la piña (*A. comosus*) en la orientación sense y anti-sense.

El BRIp lidera la expresión del *PSY*, el cassette de iARN *bLcy* y el cassette de iARN *eLcy* en las piñas. La justificación sobre la selección del BRIp se basó en los datos publicados por Moyle et al., 2005, en los cuales los autores mostraron la expresión del *BRI* optimizada para frutas durante el desarrollo de las frutas y la expresión de genes de β -glucuronidasa (*GUS*) en las piñas (Firoozabady et al., resultados no publicados).

Tabla II-1. Descripción de elementos genéticos en pHCW.T-7

Elemento genético	Tamaño (bp)	Posición	Descripción
RB	547	22395 - 21849	Región del límite derecho del T-ADN del plásmido Ti del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Repetición directa corta de los flancos del T-ADN y es necesario para la transferencia del T-ADN a las células de las plantas (Depicker et al., 1982).
Cassette marcador seleccionable			
EHIS	1625	21848 - 20224	Región promotora del gen de epóxido hidrolasa de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). Cuando se fusiona con el Ubpp, proporciona una expresión constitutiva en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011).
Ubpp	1536	20223 - 18688	La región promotora del gen tetramérico de la ubiquitina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011) Proporciona una expresión constitutiva en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011).
SuRBHra	1995	18687 - 16693	El gen <i>ALS</i> de la línea mutante de tabaco Hra codifica la enzima de acetolactato sintasa (Lee et al., 1988, GenBank ID: X07645.1). Cataliza la conversión de dos moléculas de piruvato al acetolactato y el dióxido de carbono, el primer paso realizado en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada. Esta enzima es insensible a la sulfonilurea y funciona como un marcador seleccionable de la planta.
SuRBHra3'	1763	16692 - 14930	Secuencia de término del gen de acetolactato sintasa del tabaco (Townsend et al., 2009, GenBank ID: FJ649655). Proporciona una región no traducida 3' (3'UTR) y el sitio de poliadenilación para la terminación de la transcripción.
Secuencia de intervención	49	14929 - 14881	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
Cassettes de genes funcionales			
BRIp	2452	14880 - 12429	Región promotora del gen inhibidor de la bromelina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona la expresión del gen meta optimizada para frutas.
Secuencia de intervención	8	12428 - 12421	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
PSY	1311	12420 - 11110	El gen <i>PSY</i> de mandarina codifica la enzima fitoeno sintasa (Ikoma et al., 2001, GenBank ID: AB037975). Cataliza la conversión del pirofosfato de geraniol a fitoeno (Romer et al., 2002).
Secuencia de intervención	17	11109 - 11093	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
Ubpter	940	11092 - 10153	Secuencia de término del gen tetramérico de ubiquitina (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona una región no traducida 3' y el sitio de poliadenilación para el término de la transcripción.
Secuencia de intervención	23	10152 - 10130	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.

BRIP	2452	10129 - 7678	Región promotora del gen inhibidor de la bromelina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona la expresión del gen meta optimizada para frutas.
Secuencia de intervención	12	7677 - 7666	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
<i>bLcy(+)</i>	619	7665 - 7047	Una secuencia de codificación parcial del gen licopeno β -ciclase (<i>bLcy</i>) de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011) en la orientación sense. Esta región se aisló de la piña en base a la homología de la secuencia de nucleótidos a los genes licopeno β -ciclase originarios de las plantas: genes <i>Zea mays</i> PSI (GenBank ID: AY206862, Singh et al., 2003), <i>Citrus unshiu</i> (GenBank ID: AY166796, Kim et al., no publicado), <i>Solanum lycopersicum</i> (GenBank ID: X86452, Pecker et al., 1996) y <i>Capsicum annuum</i> (GenBank ID: X86221, Hugueney et al., 1995). Proporciona la supresión del iARN de la licopeno β -ciclase endógena.
Secuencia de intervención	10	7046 - 7037	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
LSI Intron	190	7036 - 6847	Secuencia Intron 2 del gen <i>ST-LSI</i> de la papa (Eckes et al., 1986, GenBank ID: X04753.1). Proporciona estabilidad a la estructura repetida invertida en <i>Escherichia coli</i> (Hirai and Kodama, 2008) y facilita la formación de dúplex de ARN horquillados en las plantas (Wesley et al., 2002).
Secuencia de intervención	10	6846 - 6837	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
<i>bLcy(-)</i>	619	6836 - 6218	Una secuencia de codificación parcial del gen licopeno β -ciclase (<i>bLcy</i>) de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011) en la orientación anti-sense. Esta región se aisló de la piña en base a la homología de la secuencia de nucleótidos a los genes licopeno β -ciclase originarios de las plantas: Genes <i>Zea mays</i> PSI (GenBank ID: AY206862, Singh et al., 2003), <i>Citrus unshiu</i> (GenBank ID: AY166796, Kim et al., no publicado), <i>Solanum lycopersicum</i> (GenBank ID: X86452, Pecker et al., 1996) y <i>Capsicum annuum</i> (GenBank ID: X86221, Hugueney et al., 1995). Proporciona la supresión del iARN de la licopeno β -ciclase endógena.
Secuencia de intervención	13	6217 - 6205	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
Ubptcr	940	6204 - 5265	Secuencia de término del gen tetramérico de ubiquitina (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona una región no traducida 3' y el sitio de poliadenilación para el término de la transcripción.
Secuencia de intervención	41	5264 - 5224	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
BRIP	2452	5223 - 2772	Región promotora del gen inhibidor de la bromelina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona la expresión del gen meta optimizada para frutas (Wintz and Firoozabady, no publicado).

<i>eLcyf(+)</i>	504	2771 – 2268	Una secuencia de codificación parcial del gen de la licopeno ϵ -ciclase (<i>eLcyf</i>) de la piña en la orientación sense (Wintz and Firoozabady, no publicado). Esta región se aisló de la piña en base a la homología de la secuencia de nucleótidos a los genes licopeno licopeno ϵ -ciclase originarios de las plantas: <i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group) (GenBank ID: AK072015, Kikuchi et al., 2003) y <i>Adonis palaestina</i> (GenBank ID: AF321536, Cunningham and Gantt, 2001). Para la supresión de iARN de la licopeno ϵ -ciclase endógena.
Secuencia de intervención	30	2267 – 2238	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
LSI Intron	190	2237 – 2048	Secuencia Intron 2 del gen <i>ST-LSI</i> de la papa (Eckes et al., 1986, GenBank ID: X04753.1). Proporciona estabilidad a la estructura repetida invertida en <i>Escherichia coli</i> (Hirai and Kodama, 2008) y facilita la formación de dúplex de ARN horquillados en las plantas (Wesley et al., 2002).
Secuencia de intervención	10	2047 – 2038	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
<i>eLcyf(-)</i>	504	2037 – 1534	Una secuencia de codificación parcial del gen de la licopeno ϵ -ciclase (<i>eLcyf</i>) de la piña en la orientación anti-sense (Wintz and Firoozabady, no publicado). Esta región se aisló de la piña en base a la homología de la secuencia de nucleótidos a los genes licopeno licopeno ϵ -ciclase originarios de las plantas: <i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group) (GenBank ID: AK072015, Kikuchi et al., 2003) y <i>Adonis palaestina</i> (GenBank ID: AF321536, Cunningham and Gantt, 2001). Para la supresión de iARN de la licopeno ϵ -ciclase endógena.
Secuencia de intervención	2	1533 – 1532	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
Ubptir	940	1531 – 592	Secuencia de término del gen tetramérico de ubiquitina (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona una región no traducida 3' y el sitio de poliadenilación para el término de la transcripción.
Secuencia de intervención	9	591 – 583	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
LB	582	582 – 1	Región del límite izquierdo del T-ADN del plásmido Ti del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Repetición directa corta de los flancos del T-ADN y es necesario para la transferencia del T-ADN a las células de las plantas (Barker et al., 1983).
Backbone del plásmido			
p15A	1851	36559 - 34709	El origen de la replicación p15A (Chang and Cohen, 1978) para el mantenimiento de los plásmidos en <i>Escherichia coli</i> .
TetR/A	1956	34708 - 32753	El gen de tetraciclina (TetR/A) del plásmido RPI (Waters et al., 1983) como un marcador seleccionable de la <i>Escherichia coli</i> .
Secuencia de intervención	65	32752 - 32688	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.

pVS1	10292	32687 - 22396	El origen de la replicación pVS1 (Itoh et al., 1984) para el mantenimiento de los plásmidos en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al., 1984).
------	-------	---------------	--

II.C. VECTOR PLÁSMIDO pHCWfACC3'-2

El Evento EF2-114 fue producido por medio de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando dos plásmidos, el pHCW.T-7 (Figura IV-4) y el pHCWfACC3'-2 (Figura IV-6). El tamaño del plásmido de expresión pHCWfACC3'-2 es de aproximadamente 25.8 kb.

Figura II-6. Mapa circular del pHCWfACC3'-2

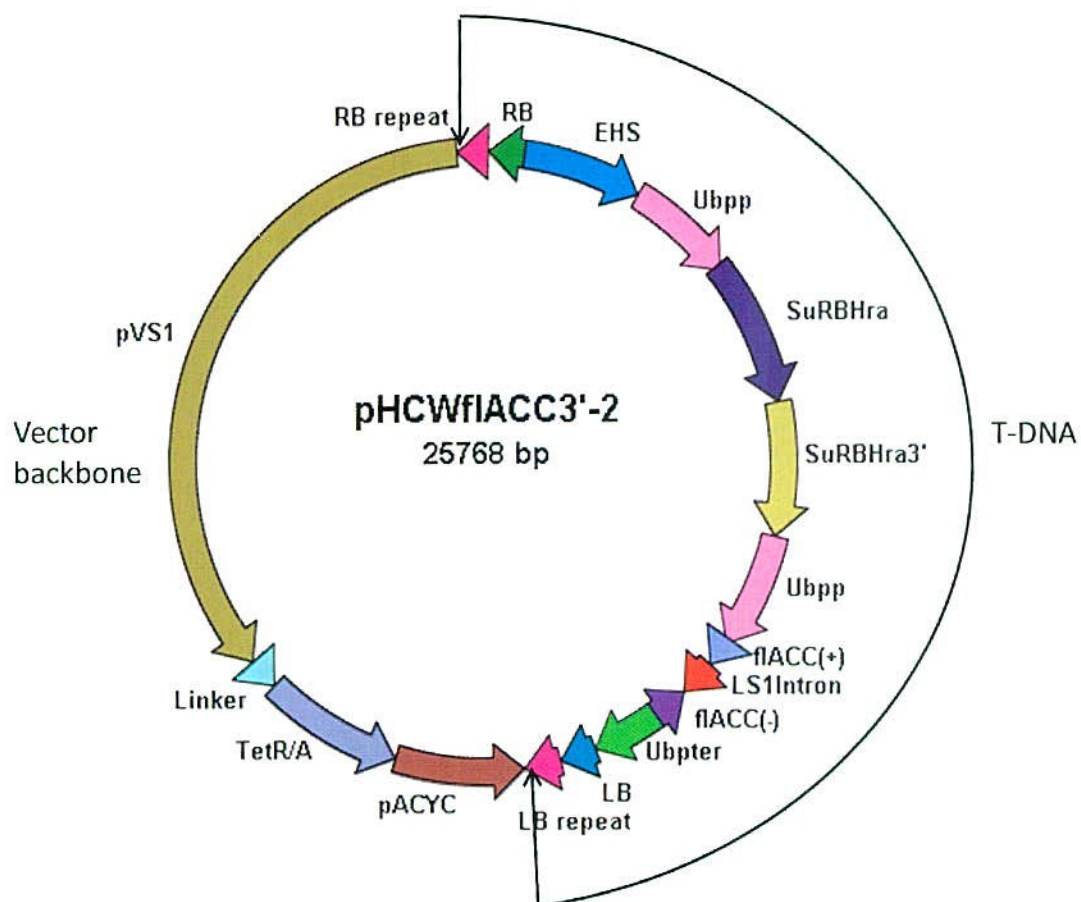
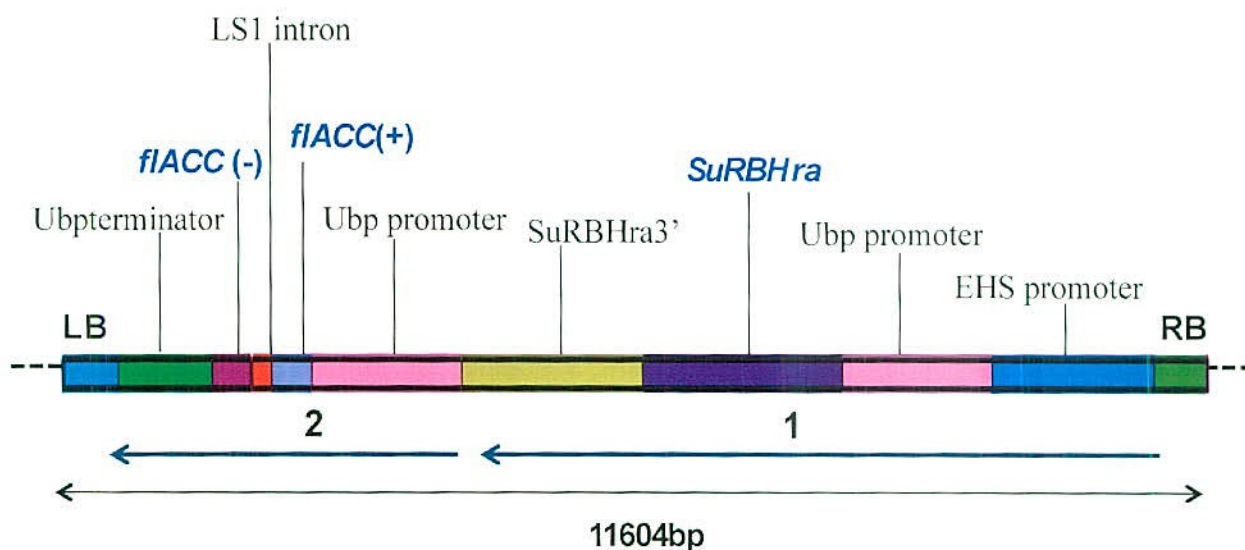


Figura II-7. Diagrama del T-ADN de pHCWflACC3'-2



Las flechas con números (1-2) indican los dos cassettes de expresión y los elementos regulatorios respectivos en el pHCWflACC3'-2

II.C.1. ELEMENTOS GENÉTICOS DEL pHCWflACC3'-2 T-ADN

El T-ADN de 11.6 kb del plásmido pHCWflACC3'-2 tiene dos cassettes de expresión. La organización y la orientación de los dos cassettes de expresión se presentan en la Figura IV-7 y se describen a continuación. Los genes de interés en los cassettes de expresión individuales se presentan con texto azul. La ubicación de cada uno de los elementos genéticos en el T-ADN (posición del par base) y su tamaño se presenta en la Tabla IV-2.

- El cassette de expresión EHS-Ubpp-*SuRBHra*-*SuRBHra*3' (marcador seleccionable de plantas) es el mismo que se describió anteriormente para pHCW.T-7 (Sección IV.B.1).
- El cassette de expresión Ubpp-*flACC*3' iARN-Ubpter está compuesto por un promotor/5'UTR del gen de ubiquitina (*Ubi*) de la piña (*A. comosus*), una porción del gen *flACC*3' de la piña (*A. comosus*) en la orientación sense, la secuencia intron 2 del gen *ST-LS1* de la papa (*S. tuberosum*) (mismo que en el pHCW.T-7), una porción del gen *flACC*3' de la piña (*A. comosus*) en la orientación anti-sense, y una secuencia de término correspondiente al 3' UTR/región de flaqueo del gen *Ubi* de la piña.

Tabla II-2. Descripción de los elementos genéticos en pHCWIIACC3'-2

Elemento genético	Tamaño (bp)	Posición	Descripción
RB	547	11604 - 11058	Región derecha del borde del T-ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Repetición directa corta que flanquea el T-ADN y es necesaria para la transferencia del T-ADN en las células de plantas (Depicker et al., 1982).
Cassette marcador seleccionable			
EHS	1625	11057 - 9433	Región promotora del gen epóxido hidrolasa de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). Cuando se fusiona con Ubpp, produce la expresión constitutiva en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011).
Ubpp	1536	9432 - 7897	La región promotora del gen tetramérico de la ubiquitina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011) Proporciona una expresión constitutiva en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011).
<i>SuRBIHra</i>	1995	7896 - 5902	El gen <i>ALS</i> de la línea mutante de tabaco Hra codifica la enzima de acetolactato sintasa (Lee et al., 1988, GenBank ID: X07645.1). Cataliza la conversión de dos moléculas de piruvato al acetolactato y el dióxido de carbono, el primer paso realizado en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada. Esta enzima es insensible a la sulfonilurea y funciona como un marcador seleccionable de la planta.
<i>SuRBIHra3'</i>	1763	5901 - 4139	Secuencia de término del gen de acetolactato sintasa del tabaco (Townsend et al., 2009, GenBank ID: FJ649655). Proporciona una región no traducida 3' (3'UTR) y el sitio de poliadenilación para la terminación de la transcripción.
Secuencia de intervención	42	4138 - 4097	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
Cassette de genes funcionales			
Ubpp	1536	4096 - 2561	La región promotora del gen tetramérico de la ubiquitina de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011) Proporciona una expresión constitutiva en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011).
Secuencia de intervención	11	2560 - 2550	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
<i>flACC(+)</i>	400	2549 - 2150	Una porción del gen meristem ACS (<i>flACC3'</i>) de la piña (Botella et al., 2000, GenBank ID: DT335956; Wintz and Firoozabady, 2011) e orientación sense. Proporciona la supresión iARN del gen endógeno.
Secuencia de intervención	14	2149 - 2136	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
LSI Intron	190	2135 - 1946	Secuencia Intron 2 del gen <i>ST-LSI</i> de la papa (Eckes et al., 1986, GenBank ID: X04753.1). Proporciona estabilidad a la estructura repetida invertida en <i>Escherichia coli</i> (Hirai and Kodama, 2008) y facilita la formación de dúplex de ARN horquillados en las plantas (Wesley et al., 2002).

Elemento genético	Tamaño (bp)	Posición	Descripción
Secuencia de intervención	6	1945 - 1940	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
<i>flACC(-)</i>	400	1939 - 1540	Una porción del gen meristem ACS (<i>flACC3'</i>) de la piña (Botella et al., 2000, GenBank ID: DT335956; Wintz and Firoozabady, 2011) e orientación anti-sense. Proporciona la supresión iARN del gen endógeno.
Secuencia de intervención	8	1539 - 1532	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
Ubptter	940	1531 - 592	Secuencia de término del gen tetramérico de ubiquitina (Wintz and Firoozabady, 2011). Proporciona una región no traducida 3' y el sitio de poliadenilación para el término de la transcripción.
Secuencia de intervención	9	591 - 583	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
LB	582	582 - 1	Región izquierda del borde del T-ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Repetición directa corta que flanquea el T-ADN y es necesaria para la transferencia del T-ADN en las células de plantas (Barker et al., 1983).
Backbone del plásmido			
p15A	1851	25768 - 23918	El origen de la replicación p15A (Chang and Cohen, 1978) para el mantenimiento de los plásmidos en <i>Escherichia coli</i> .
TetR/A	1956	23917 - 21962	El gen de tetraciclina (TetR/A) del plásmido RP1 (Waters et al., 1983) como un marcador seleccionable de <i>Escherichia coli</i> .
Secuencia de intervención	65	21961 - 21897	Secuencia utilizada para la clonación del ADN.
pVS1	10292	21896 - 11605	El origen de la replicación pVS1 (Itoh et al., 1984) para el mantenimiento de los plásmidos en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al., 1984).

II.D. SECUENCIAS REGULATORIAS

Los cassettes de expresión en pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2 contienen promotores y secuencias de terminación de transcripción derivadas de la piña (*Ananas comosus*).

EHS-Ubpp es un promotor de la fusión compuesto de la secuencia promotor/5'UTR del gen de epóxido hidrolasa (*EHS*) y el promotor/5'UTR del gen tetramérico de ubiquitina (*Ubi*). Las epóxido hidrolasas son una clase de enzimas que catalizan la hidratación de los epóxidos químicamente reactivos a sus productos dihidrodiol correspondientes (Fretland and Omiecinski, 2000). En las plantas, las epóxido hidrolasas tienen un rol importante en el metabolismo del ácido oleico (Blée, 1998). Los ácidos oleicos son partes importantes de las cutinas, las cuales a su vez comprometen las cutículas que protegen a las plantas contra la deshidratación. Adicionalmente, también sirven como moléculas de señalización durante los ataques de patógenos (Schweizer et al., 1996). En las frutas de piña y las partes aéreas, se ha reportado la

expresión optimizada de un gen de la epóxido hidrolasa (GenBank ID: AY098527) (Neuteboom et al., 2002).

La ubiquitina es una proteína que se encuentra en todas las células eucarióticas y está implicada en procesos como el recambio de proteínas, la estructura de cromatina, el control de ciclos celulares, la reparación del ADN y la respuesta al ataque de patógenos y otros estreses (Vierstra, 1996). Los vectores de ubiquitina basados en promotores se han utilizado exitosamente para la transformación de varias especies monocotiledóneas (Wilmink et al., 1995), incluyendo varios cereales (McElroy and Brettell, 1994). En la piña, un gen tetramérico de ubiquitina (GenBank ID: AY098526) ha demostrado ser expresado de manera constitutiva (Neuteboom et al., 2002).

Ambos promotores fueron aislados de la piña por Wintz and Firoozabady (2011). En general, la actividad del promotor de fusión EHS-Ubpp en la pulpa de la piña ha demostrado ser mayor que o igual al promotor individual Ubpp y mucho mayor que el promotor individual EHS por medio de un sistema de análisis de expresión transitoria de genes utilizando el gen β -glucuronidasa (*GUS*) (Wintz and Firoozabady, 2011 and Firoozabady et al., resultados no publicados). En el Evento EF2-114, el EHS-Ubpp lidera la expresión del gen marcador seleccionable.

El BRIp es una secuencia promotora optimizada para frutas del gen *BRI* de la piña (Moyle et al., 2005). Se piensa que la función fisiológica del BRI es la regulación de la actividad de la proteínas coexistente en la célula, aunque su función detallada aún no está clara. En la piña, bajo las condiciones ácidas de las vacuolas, el BRI bloquea la actividad de la bromelaína y/u otras proteinasas y protege a otras proteínas contra la proteólisis (Sawano et al., 2002). En el Evento EF2-114, el BRIp lidera la expresión específica de los cassettes de iARN *PSY*, *bLcy* iARN, y *eLcy* en las frutas de la piña. La justificación detrás de la selección del BRIp estuvo basada en los datos publicados por Moyle et al., 2005, en los cuales los autores mostraron la expresión del *BRI* optimizada en la fruta en los cuales los autores mostraron la expresión optimizada por la fruta del *BRI* durante el desarrollo de la fruta de la pila.

El Ubpp es el promotor/5' UTR del gen tetramérico de ubiquitina (*Ubi*) aislado de la piña (Wintz and Firoozabady, 2011). En el Evento EF2-114, Ubpp lidera la expresión constitutiva del cassette de iARN *fIACC3'* en la piña (Wintz and Firoozabady, 2011 and Firoozabady et al., resultados no publicados).

El Ubpter es la región de flanqueo/3' UTR del gen tetramérico *Ubi* de la piña (*A. comosus*) que sirve como un terminador de la transcripción (Wintz and Firoozabady, 2011).

El ST-LSI intron es la secuencia Intron 2 del gen *ST-LSI* de la papa (*Solanum tuberosum*) (Eckes et al., 1986, GenBank ID: X04753.1), el cual funciona para estabilizar las secuencias repetidas invertidas en *Escherichia coli* y facilita la formación de la horquilla dúplex de ARN en las plantas (Hirai and Kodama, 2008; Wesley et al. 2001).

II.E. LÍMITES T-ADN

La secuencia del límite derecho en los plásmidos pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2 incluye una región repetida de 25 bp, aislada originalmente del *Agrobacterium tumefaciens* pTiT37 (Depicker et al., 1982), el cual actúa como un punto de inicio de la transferencia del T-ADN en las células de plantas. De manera similar, la secuencia del límite izquierdo incluye una región repetida de 25 bp aislada originalmente del *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 (Barker et al., 1983) que delimita y actúa como un punto final de la transferencia de T-ADN en las células de plantas.

II.F. ELEMENTOS GENÉTICOS FUERA DE LOS LÍMITES DE T-ADN

Los vectores de transformación son derivados de un plásmido binario, el pALS1301 (Firoozabady et al., 2006). Los elementos genéticos fuera del T-ADN en los plásmidos pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2 son idénticos. El backbone del vector está compuesto por tres elementos clave: El origen de la replicación pVS1 (Itoh et al., 1984) para el mantenimiento de los plásmidos en *Agrobacterium*, el gen de tetraciclina (TetR/A) del plásmido RP1 (Waters et al., 1983) como un marcador seleccionable de *Escherichia coli*, y el origen de la replicación p15A (Chang and Cohen, 1978) para el mantenimiento de los plásmidos en *Escherichia coli*. La clonación de los elementos genéticos individuales y el ensamble de los vectores de transformación se realizaron utilizando las técnicas de biología molecular recombinante estándar (Maniatis et al., 1982; Sambrook and Russell, 2001).

II.G. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN

El Evento EF2-114 se desarrolló a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* de la variedad MD2 de la piña (*Ananas comosus*) en base al método descrito por Firoozabady (2011). Brevemente las secciones longitudinales de los procesos *in vitro* (Firoozabady and Gutterson, 2003) se prepararon y cultivaron. Las secciones base de la hoja se prepararon a partir de las secciones longitudinales y se co-transformaron con dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90) (Konec and Schell, 1986) transportando los plásmidos binarios pHCW.T-7 (Figura IV-4) y pHCWflACC3'-2 (Figura IV-6), respectivamente.

Luego de la co-cultivación, las secciones de base de hoja se transfirieron al medio de recuperación con carbenicilina para eliminar el *Agrobacterium* y luego fueron transferidas al medio de selección con los antibióticos vancomicina y cefotaxim para eliminar el *Agrobacterium* residual y el clorsulfuron (CS), como un herbicida para seleccionar las células de plantas transformadas y para producir meristems organogénicos transformados. Se realizó un total de ocho transferencias con mayor presión de selección a partir de los niveles sub-letales a letales de CS para producir botones pequeños transgénicos. La presión de selección fue esencial debido a que el promotor constitutivo débil no soportó, inmediatamente luego del periodo de recuperación, la supervivencia de las células transformadas en presencia de concentraciones letales de CS, las cuales se convirtieron posteriormente en botones transformados. Los grupos de botones pequeños se transfirieron dos veces a los medios con CS y cefotaxim para crecer y

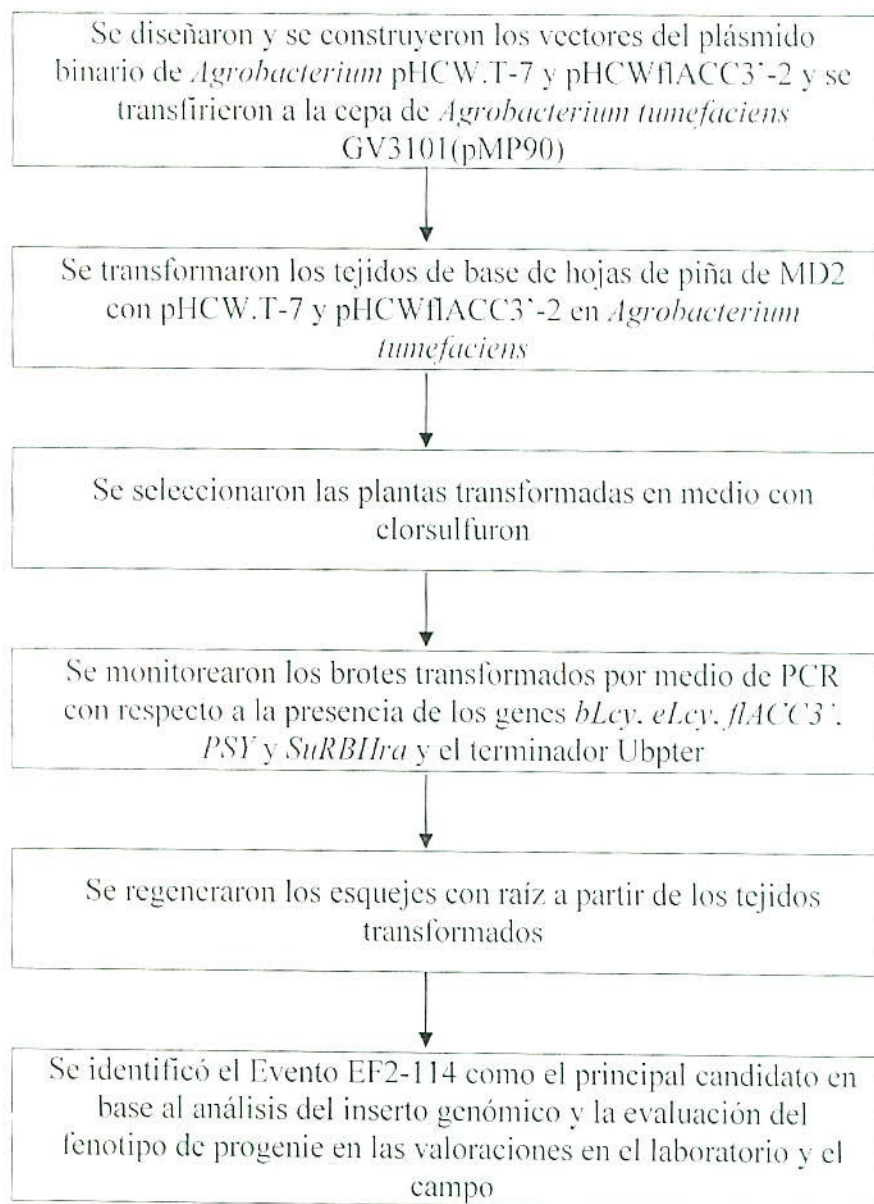
multiplicar los brotes y los botones de brotes. Los brotes y los botones de brotes se transfirieron a medios solidificados de agar para normalizar los brotes transformados y los botones de brotes y luego se transfirieron a un medio líquido con CS cada 4 – 6 semanas para multiplicar y alargar los brotes transformados. Los análisis PCR confirmaron la presencia de los genes introducidos en brotes derivados de cultivos de tejidos.

Las plantas transgénicas T_0 fueron enviadas a la Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte (CDADM), Buenos Aires, Costa Rica para su evaluación. En CDADM, las plantas se cultivaron en un invernadero durante 15 – 20 semanas antes de transferirlas a la tierra para estudios de campo confinados (Permiso del Ministerio de Agricultura de Costa Rica #GB-122-05). Las plantas se cultivaron de acuerdo con las prácticas de producción agronómica estándar hasta que produjeran frutas. Las frutas se cortaron para valorar el color de la pulpa interna y las características de calidad ($^{\circ}$ Brix, ácido cítrico, ácido ascórbico y pH). Únicamente las plantas que tenían frutas con un color interno rosado/rojo seguían el proceso para propagación adicional en el campo o en el cultivo de tejidos. Los cultivos Meristem se produjeron principalmente a partir de la corona (y ocasionalmente del escape o retoño) de las plantas T_0 . Los propágulos T_1 fueron cultivados para evaluación adicional y subsecuentemente fueron utilizados para las valoraciones moleculares y fenotípicas. Los análisis moleculares (PCR y Southern) confirmaron la presencia de genes introducidos en las plantas derivadas del cultivo de tejidos así como las plantas propagadas en el campo. Los pasos principales en el desarrollo del Evento EF2-114 se presentan en la Figura IV-8.

II.H. DESARROLLO DE LOS MATERIALES DE PRUEBA Y CONTROL

La Figura IV-9 lista los genotipos y descripciones del Evento EF2-114 y los materiales de plantas de control MD2 no transgénicas utilizadas en los estudios descritos en este sometimiento. Los métodos y las condiciones del cultivo de los materiales de prueba y control utilizados en estos estudios se han descrito en el Anexo A.

Figura II-8. Proceso para el desarrollo del Evento EF2-114



II.I. REFERENCIAS

- Adams DO and Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico as an intermediate in the conversion of metionina to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:170-174.
- Barker R, Idler K, Thompson D and Kemp J. 1983. Nucleotide sequence of the T-ADN region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol. 2:335-350.
- Blée E, Summerer S, Flenet M, Rogniaux H, Dorsselaer AV and Schuber F. 2005. Soybean epóxido hidrolasa: identification of the catalytic residues and probing of the reaction mechanism with secondary kinetic isotope effects. J. Biol. Chem. 280:6479-6487.
- Chang AC and Cohen SN. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy ADN cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134:1141-1156.
- Cunningham FX Jr and Gantt E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by licopeno varepisilon-ciclasas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2905-2910.
- Cunnigham FX Jr, Pogson B Jr., Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D and Gantt E. 1996. Functional analysis of the β and ϵ licopeno ciclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. Plant Cell 8:1613-1626.
- da Cunha GAP. 2005. Applied aspects of pineapple flowering. Bragantia 64(4):499-516.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P and Goodman HM. 1983. Nucleotide sequences and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. J. Mol. Appl. Genet. 1:499-511.
- 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(1):14-22.
- Firoozabady E. 2011. US Patent No. 8,049,067. Organogenic transformation and regeneration. Australia Patent No. 2003302775. Philippine Patent No. 1-2005-501063. Israel Patent No. 168921. Europe Patent No. 3808448.9 (pending).
- Firoozabady E and Gutterson N. 2003. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. Plant Cell Rep. 21:844-850.

- Firoozabady E, Heckert M and Gutterson N. 2006. Transformation and regeneration of pineapple. *Plant Cell Tiss. Org.* 84:1-16.
- Fraser PD and Bramley P. 2009. Genetic manipulation of carotenoid content and composition in crop plants. *Carotenoids* 5:99-114.
- Fretland AJ and Omiecinski CJ. 2000. Epóxido hidrolasas: biochemistry and molecular biology. *Chem. Biol. Interact.* 129:41-59.
- Hammond SM, Caudy AA and Hannon GJ. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev. Genet.* 2:110-119.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:210-218.
- Hugueney P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B and Kuntz M. 1995. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J.* 8 (3):417-424.
- Ikoma Y, Komatsu A, Kita M, Ogawa K, Omura M, Yano M and Moriguchi T. 2001. Expression of a fitoeno sintasa gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* 111:232-238.
- Itoh Y, Watson JM, Haas D and Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220.
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al. 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28.000 cADN clones from japonica rice. *Science* 301(5631):376-379.
- Kim I-J, Nam T-S, Kim C-S and Chung W-T. 2002. Isolation of a cADN encoding licopeno ciclasa from citrus. *Genbank* AY166796.1.
- Konec C and Schell J. 1986. The promoter of Ti-ADN gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genetics* 204:383-396.
- Lee KY, Townsend J, Tepperman J, Black M, Chui CF, Mazur B, Dunsmuir P and Bedbrook J. 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
- Lee Y-T and Duggleby G. 2006. Mutations in the regulatory subunit of yeast acetolactate synthase affect its activation by Mg ATP. *Biochem. J.* 395:331-336.
- Ma C, Ma B, He J, Hao Q, Lu X and Wang L. 2011. Regulation of carotenoid content in tomato by silencing of licopeno β/ϵ -ciclasa genes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29:117-224.

- Mazur BJ and Falco SC. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40:441-470.
- McElroy D and Brettell RIS. 1994. Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends in Biotechnol.* 12:62-68.
- Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M and Botella JR. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J. Expt. Bot.* 56 (409):101-112.
- Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D and Christopher DA. 2002. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science* 163:1021-1035.
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX Jr. and Hirschberg J. 1996. Cloning and characterization of the cADN for licopeno beta-ciclasa from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 30(4):807-819.
- Ray T. 1984. Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol.* 75:827-831.
- Salisbury FB and Ross CW. 1992. *Plant Physiology*. Fourth edition. Belmont, CA: Wadsworth, Inc. 682 p.
- Sawano Y, Muramatsu T, Hatano K, Nagata K and Tanokura M. 2002. Characterization of genomic sequence coding for bromelain inhibitors in pineapple and expression of its recombinant isoform. *J. Biol. Chem.* 277(31):28222-7.
- Singh M, Lewis PE, Hardeman K, Bai L, Rose JK, Mazourek M, Chomet P and Brutnell TP. 2003. Activator mutagenesis of the pink scutellum1/viviparous7 locus of maize. *Plant Cell* 15(4):874-884.
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK and Voytas, DF. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459 (7245):442-445.
- Turnbull CGN, Nissen RJ, Sinclair ER, Anderson KL and Shorter AJ. 1993. Ethephon and causes of flowering failure in pineapple. *Acta Hort.* 334:83-88.
- Vierstra RD. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Mol. Biol.* 32:275-302.
- Wang KL, Li H and Ecker JR. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*. S131-S151, Supplement 2002.

- Watanabe Y. 2011. Overview of plant iARN. Kodama. H. Komamine A. (eds.). iARN and plant gene function analyses. *Methods Mol. Biol.* 744:1-11.
- Waters SH, 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.
- Wilmink A, van de Ven BC and Dons JJ. 1995. Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae. *Plant Mol. Biol.* 28:949-955.
- Wintz H-C and Firoozabady E. 2011. Plant promoters, terminators, genes, vectors and related transformed plants. Australia Patent No. 2006236392. Pending in U.S. and EU (Patent publication no. 2006113709/WO-A2).

Estabilidad generacional

Para valorar la estabilidad del ADN insertado en el Evento EF2-114 a través de diferentes generaciones, se realizó un análisis de manchado Southern utilizando ADN obtenido de cuatro generaciones de plantas de Evento EF2-114. Para referencia, se presenta el diagrama de propagación del Evento EF2-114 en la Figura IV-9. Las generaciones específicas probadas también se indican en la Figura IV-9.

El análisis de manchado Southern incluyó ADN genómico de los tejidos de las hojas de las plantas de piña MD2 y de cuatro generaciones (Figura IV-9: T₁-TC, T₁, T₂ y T₃) del Evento EF2-114. Para este análisis se utilizó el manchado Southern con ADN genómico digerido con *NdeI* y probado con la sonda *EHS* (Figura V-20, Tabla V-10). Se debe mencionar que esta porción de ambos T-ADNs es idéntica en los dos plásmidos y según se mencionó anteriormente, se espera que la sonda *EHS* se hibridice en ambos.

Figura II-9. Estabilidad generacional – Mapa del pHCW.T-7/pHCWflACC3'/NdeI

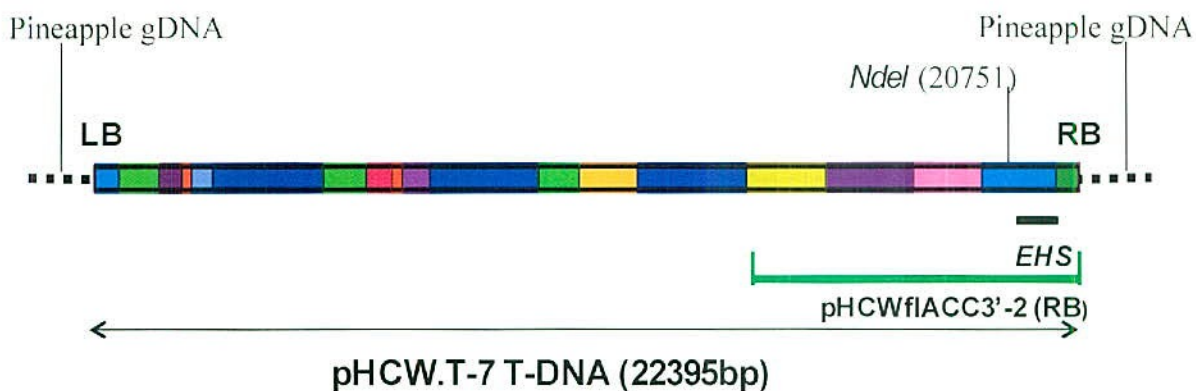


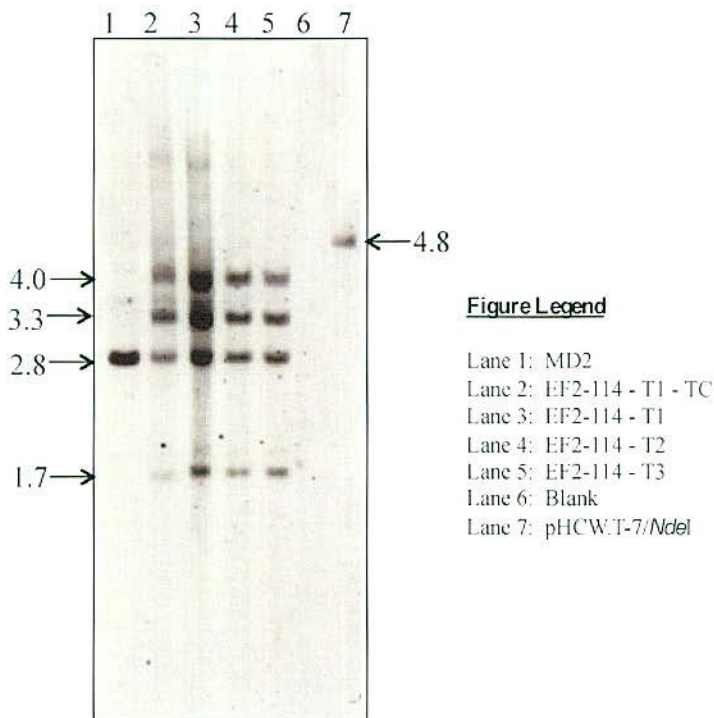
Tabla II-3. Estabilidad generacional - pHCW.T-7/pHCWflACC3'-2 T-ADN - Tamaño(s) de las bandas de hibridización esperadas y observadas

Enzima de restricción en T-ADN/gADN	Sonda	Posición y tamaño de la sonda (bp)	Bandas esperadas en EF2-114 (kb)	Bandas observadas en EF2-114 (kb)	Banda esperada en el plásmido de control (kb)
<i>NdeI</i> (20751)/ <i>NdeI</i>	<i>EHS</i>	20779 - 21772 (993)	Endógeno & >1.6	1.7, 2.8 (Endógeno), 3.3 & 4.0	4.8

El resultado del análisis Southern se presenta en la Figura V-21. La banda de 2.8 kb presente en

el MD2 en la Línea 1 en la Figura V-21 es el resultado de la hibridización de la sonda al *EHS* endógeno. Hay tres bandas adicionales que se hibridizan a 1.7, 3.3 y 4.0 kb. Las tres bandas son >1.6 kb según se esperaba. Por un lado, a partir de este Southern que utilizó una sola digestión de restricción, se puede interpretar que hay tres integraciones desde el límite derecho, cumulativo de ambas plásmidas. Por otro lado, el Southern con dos enzimas de restricción (Figura V-6, *NcoI/BamHI*) confirmó la presencia de un total de ocho integraciones a partir de ambos plásmidos. Esto demuestra que en la digestión individual, algunas de las bandas de hibridización podrían migrar juntas debido a los reacomodos con repeticiones en tándem o invertidas de las estructuras de T-ADN. Sin embargo, para el análisis de estabilidad generacional, el mantenimiento del mismo patrón de hibridización en varias generaciones es más importante que la migración conjunta de las bandas. El patrón de hibridización que se presenta en la Figura V-21 Líneas 2, 3, 4, y 5 corresponde a las generaciones T₁-TC, T₁, T₂ y T₃ respectivamente, es idéntico, lo que confirma la estabilidad de el/los T-ADN(s) introducidos. Por ende, este análisis confirmó la estabilidad de las inserciones de T-ADN sin ninguna modificación en las cuatro generaciones probadas.

Figura II-10. Mancha Southern – Estabilidad generacional



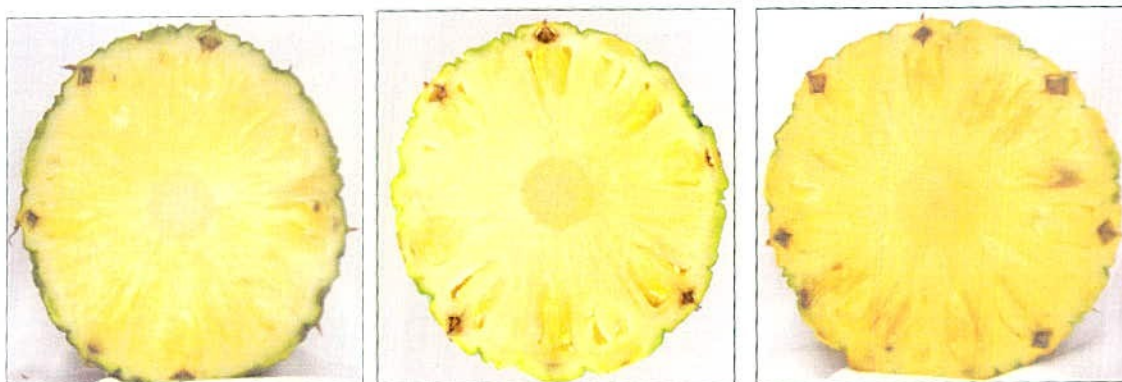
Estabilidad generacional para el color interno de la fruta:

También examinamos el color interno de las frutas en seis generaciones de propagación (T₀, T₁-TC, T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅). Aunque la variedad parental de MD2 tiene una pulpa de color dorado, las frutas del Evento EF2-114 exhiben una pulpa de color rosado / rojo debido a la acumulación del licopeno. En todas las generaciones, el color rosado y la

uniformidad fueron similares a las plantas iniciales del Evento EF2-114 (T0). Las fotografías de las muestras de las tres frutas representativas para cada generación se presentan en la Figura V-22. Para los análisis estadísticos del color interno, ver el Anexo H, Tabla H-2.

Figura II-11. Estabilidad generacional para el color interno de la fruta

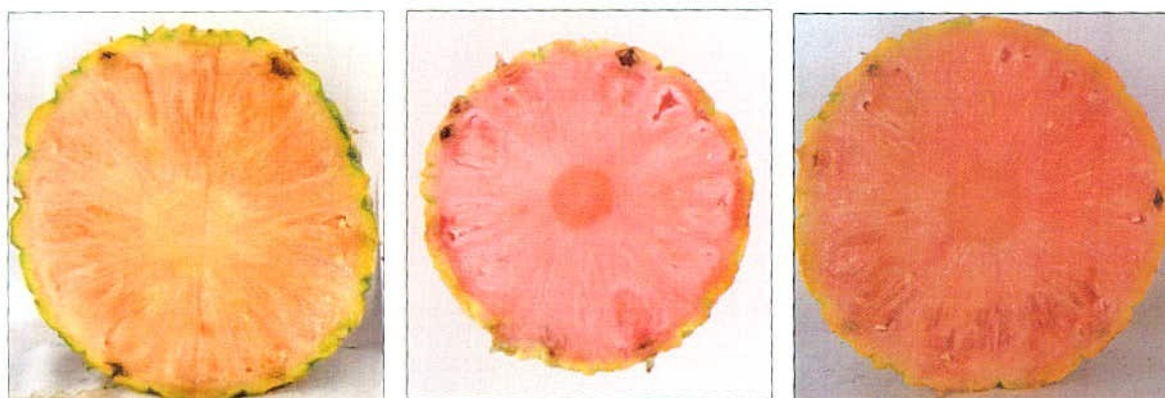
MD2



Generación T₀



Generación T₁-TC



Generación T_1



Generación T_2



Generación T_3



Generación T₄



Generación T₅



II.I.1. RESUMEN DEL ANÁLISIS DE ESTABILIDAD GENERACIONAL

Los datos de hibridización Southern del ADN genómico de las plantas de piña de cuatro generaciones con la sonda *EHS* establecieron que los T-ADNs de ambos plásmidos de transformación se mantuvieron estables en cuatro generaciones de plantas del Evento EF2-114. Adicionalmente, el color interno de las frutas se mantuvo estable durante las seis generaciones de propagación que se probaron.

II.J. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESIÓN DEL EVENTO EF2-114

Los tejidos de piña son recalcitrantes a la extracción de proteínas y ácidos nucleicos. La dificultad para obtener proteínas de alta calidad y ácidos nucleicos de los tejidos de las frutas de piña, particularmente, se debe principalmente a sus bajas concentraciones sobre el peso fresco, a la alta actividad de proteasas y nucleasas y a los altos niveles de compuestos de interferencia como por ejemplo polifenoles y polisacáridos (Song et al., 2006). Para producir suficientes cantidades de proteínas PSY y SuRBHra para realizar los estudios de seguridad recomendados por los lineamientos del Códex, se hicieron intentos para sobre expresar los genes *PSY* y *SuRBHra* en *Escherichia coli*. Los genes se clonaron en los vectores de expresión pQE-60 (Qiagen, Valencia, CA). El vector pQE-60 tiene un sistema promotor Tn-5 /operador lac,

inducible por IPTG (isopropil tiogalactopiranoside) y una etiqueta de histidina C-terminus para la purificación de afinidad del nickel. La proteína PSY no se expresó en este sistema. La proteína SuRBHra estaba ubicada exclusivamente en los cuerpos de inclusión en *Escherichia coli* y la purificación requería de condiciones de desnaturalización difíciles como el uso de 8M urea. Las proteínas purificadas bajo estas condiciones no son apropiadas para el uso en la digestión *in vitro*, la estabilidad en el calor, o los análisis de toxicidad aguda.

Se hicieron múltiples intentos para valorar los niveles de expresión de las proteínas enteras introducidas, SuRBHra y PSY, en el Evento EF2-114 utilizando manchado Western (los datos no se muestran). Para la expresión PSY por medio de manchado Western, las muestras de fruta de piña se enviaron al Dr. Ralf Welsch (Universidad de Friburgo, Friburgo, Alemania), cuyo laboratorio tiene experiencia en el trabajo con enzimas de la vía de biosíntesis de carotenoides. El laboratorio Welsch anteriormente había creado anticuerpos anti-PSY contra el PSY *Arabidopsis* PSY (GenBank ID: NM_121729), los cuales demostraron reacciones cruzadas con los anticuerpos PSY *Arabidopsis* (Maass et al., 2009). El PSY *Arabidopsis* tiene una similitud del 80% con el PSY de la mandarina en el nivel de aminoácidos. Debido a que nuestros intentos de expresar la proteína PSY en *Escherichia coli* fallaron, se enviaron muestras de fruta de piña al laboratorio Welsch y se realizaron manchados Western utilizando los anticuerpos anti-PSY de *Arabidopsis*. Los anticuerpos tuvieron reacciones cruzadas malas con respecto a la proteína meta en los manchados, lo que produjo una razón de señal a ruido muy baja.

Para el análisis de manchado Western del SuRBHra en el Evento EF2-114, se utilizaron los anticuerpos creados contra la proteína purificada bajo condiciones de desnaturalización a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli*. Los anticuerpos tuvieron reacciones cruzadas malas con respecto a la proteína meta en los manchados lo que produjo una razón de señal a ruido muy baja. De acuerdo con lo anterior, fue necesario utilizar métodos alternativos para valorar la expresión SuRBHra y PSY en el Evento EF2-114.

De manera similar, se hicieron múltiples intentos para valorar la expresión del SuRBHra y el PSY y la supresión del *bLcy* y *eLcy* en el Evento EF2-114 utilizando el análisis de mancha Northern. Las manchas Northern generalmente requieren 5-10 µg del ARN total para cada línea de las manchas y el aislamiento de esta cantidad de los tejidos de la piña, particularmente de las frutas, resultó difícil. Por ende, el PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) se seleccionó como el método principal para evaluar la expresión de los genes introducidos en el Evento EF2-114 debido a dificultades técnicas para la extracción de suficientes proteínas de alta calidad y ARN de tejidos de la piña, y la falta de los anticuerpos necesarios para los análisis.

El qRT-PCR se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para la detección y/o comparación de los niveles de expresión de genes. El qRT-PCR es atractivo ya que requiere cantidades mínimas (ng) del formato ARN y utiliza moléculas de reporte fluorescentes para monitorear los productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción PCR. El qRT-PCR combina la amplificación de ácido nucleico y los pasos de detección en un análisis homogéneo

con un amplio rango dinámico de detección y una muy alta sensibilidad. A diferencia de las hibridaciones Northern, la necesidad para la post-manipulación del ARN se elimina en el qRT-PCR, haciendo que sea un método más exacto para la comparación de los niveles de expresión de genes. El qRT-PCR difiere del PCR clásico debido a la medición del producto PCR amplificado en cada ciclo de la reacción PCR. En la práctica, una cámara de video registra en tiempo real la luz emitida por el fluorocromo incorporado en la nueva sintetización del producto PCR.

II.K. EXPRESIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL EVENTO EF2-114

Según se describió anteriormente en la Sección IV, el Evento EF2-114 fue desarrollado a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de dos plásmidos, pHCW.T-7 y pHCW Δ ACC3'-2. El plásmido pHCW.T-7 cuenta con tres genes, *PSY*, *bLcy* y *eLcy*, para la manipulación de los carotenoides. La expresión de los tres genes está bajo control del promotor BR1p optimizado para frutas. El plásmido pHCW Δ ACC3'-2 cuenta con una porción del gen de control de floración, *flACC3'*, como un constructo de iARN, la expresión del cual está bajo el control del promotor Ubp constitutivo. Ambos plásmidos de expresión también transportan el gen *SuRBHra* como un marcador seleccionable de plantas, la expresión del cual está bajo el control de un promotor de fusión constitutivo EHS-Ubpp. Se realizaron distintos análisis para valorar el nivel de expresión de los genes introducidos en el Evento EF2-114.

Para este estudio, las muestras de ARN se prepararon en el laboratorio de Del Monte Fresh Produce (Richmond, CA) y el qRT-PCR fue realizado por Syd Labs, Inc., (Malden, MA). En el Evento EF2-114, se realizó el qRT-PCR para los siguientes genes en relación a la expresión de los genes nativos de la piña β -actin o bromelaina (*BRI*):

1. Sobreexpresión de *PSY*
2. Expresión constitutiva de *SuRBHra*
3. Supresión *bLcy*
4. Supresión *eLcy*
5. Supresión *flACC3'* y
6. Expresión nativa del *BRI*.

La expresión de genes en el MD2 parental no transgénico se utilizó como un comparador. El gen β -actin de la piña se utilizó como un control de normalización en todos los análisis qRT-PCR. Los detalles de la recolección de muestra y el protocolo para el aislamiento del ARN total de las hojas de piña y las frutas descritas en el Anexo B. El protocolo qRT-PCR utilizado por Syd Labs se describe en el Anexo B.

En el análisis actual, los niveles de transcripción en el Evento EF2-114 se normalizaron a los niveles de transcripción de β -actin de la piña y se expresaron en relación al contenido en MD2. Los datos representan el promedio de tres replicados técnicos de un replicado biológico o nueve replicados técnicos de tres replicados biológicos.

II.K.1. EXPRESIÓN *PSY*

Se hicieron varios intentos para detectar la expresión del gen *PSY* introducido en el Evento EF2-114 por medio de qRT-PCR, tomando en cuenta la naturaleza espacial y temporal del promotor BRI. Todos los intentos produjeron valores $C_t > 35$ y por ende, los niveles de transcripción *PSY* estuvieron por debajo del nivel del umbral de detección.

La falta de transcripciones *PSY* detectables en el Evento EF2-114 produjo la presunción de que la actividad de los genes endógenos de la piña *PSY* podrían estar contribuyendo a la formación de suficiente fitoeno en la vía biosintética de carotenoides en las frutas, lo que produce la acumulación del (color rosado/rojo) en las frutas. Para evaluar esta presunción, se hicieron esfuerzos para detectar el nivel de transcripción del *PSY* endógeno en el Evento EF2-114 y las frutas MD2. Recientemente, se han identificado dos genes *PSY* parciales específicos para frutas (*UT1* con 342 bp de región de codificación y *UT2* con 214 bp de región de codificación) a través de la secuenciación paralela de la trascriptoma de la fruta de la piña (Ong, et al., 2012; V. S. Kumar, comunicación personal). Utilizando las secuencias de los genes *UT1* y *UT2*, se diseñaron los imprimadores específicos y el análisis qRT-PCR se realizó con el ARN aislado de las frutas 106, 131 y 154 días luego del forzado (DAF). Los resultados se resumen en la Tabla VI-5 y en la Figura VI-3.

Según se observó en la Tabla VI-5 y la Figura VI-4, los niveles de transcripción de *UT1* y *UT2* endógeno fueron muy similares en el Evento EF2-114 en relación al MD2, respaldando la presunción de que el flujo de fitoeno en la vía biosintética del carotenoide se mantiene a través de la expresión de los genes *PSY* en la fruta, disminuyendo o eliminando la necesidad de sobre expresar el *PSY* exógeno para acumular el licopeno.

La falta de expresión del gen *PSY* de mandarina introducido bajo el control del promotor BRI optimizado para frutas ha producido varias posibilidades, incluyendo el silenciamiento de genes de transcripción (TGS) y/o silenciamiento de genes post-transcripción (PTGS) en las frutas del Evento EF2-114. El resultado de los TGS es la inhibición del transgen y el resultado del PTGS es la degradación del ARN de transgenes (Paszowski and Whitham, 2001). Debido a que el qRT-PCR mide el nivel estable de las transcripciones, aún no está claro si la transcripción del *PSY* heterólogo no se había iniciado o se había inhibido en el núcleo, o el ARN transcrito se degradó antes de llegar al citoplasma.

Hay varios estudios que han asociado la metilación de las secuencias promotoras que producen TGS y la metilación de la región transcrita a PTGS en las plantas transgénicas (Vaucheret et al., 1998). En el plásmido de transformación, pHCW.T-7, el promotor de BRI se repite tres veces. Si la metilación promotora del promotor BRI ha tenido un rol en el silenciamiento del *PSY*, puede ser correcto asumir que podría haber afectado las tres instancias. Sin embargo, esto no parece ser el caso ya que la supresión mediada por iARN del *bLcy* y *eLcy* producida por la secuencia

promotora idéntica en el mismo constructo ha funcionado según las expectativas (Tabla VI-5, Figura VI-3).

Los ARNs de interferencia pequeños (siRNA) en las orientaciones sense y antisense específicas para las secuencias transgénicas transcritas también se han detectado y han demostrado tener un rol importante en PTGS (Hamilton and Baulcombe, 1999) en las plantas transgénicas. Similarmente, se ha descrito una correlación entre siRNAs específicos para la región promotora y TGS (Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001).

Varios estudios respaldaron la hipótesis de que el silenciamiento es activado por concentraciones umbrales de transcripción transgénica u otro producto de la expresión transgénica (Lindbo et al., 1993). Por ejemplo, la frecuencia del silenciamiento estaba positivamente correlacionada con las potencias de promoción de los genes introducidos (Que et al., 1997) y el silenciamiento fueron más pronunciadas en las plantas homocigotas que en las plantas hemicigotas (resumido en Vaucheret et al., 1998). Esto puede ser cierto cuando el silenciamiento del transgen *PSI* de mandarina en el Evento EF2-114. Se puede asumir que la transcripción de los dos genes *PSY* nativos en las frutas de la piña (*UT1* y *UT2*) podrían haber contribuido a la acumulación de las transcripciones *PSY* a niveles de umbral en las frutas, detonando el silenciamiento de la transcripción del transgen. El mecanismo de sensibilidad del umbral ARN podría tener un rol importante como un sistema de vigilancia genómica capaz de defender un genoma contra los parásitos moleculares como transposones y virus (Schubert et al., 2004).

Otras posibilidades del faltante de la expresión detectable del *PSY* de la mandarina en el Evento EF2-114 incluyen el número y la organización de las copias transgénicas y la influencia de las regiones genómicas en la vecindad de los sitios de inserción T-ADN (Butaye et al., 2005). En base al análisis Southern, hay cuatro copias del gen *PSY* de dos sitios de integración del plásmido pHCW.T-7. La caracterización detallada de las 132 líneas transgénicas de *Arabidopsis* que tienen múltiples genes de reporte no reveló ningún caso de silenciamiento debido al sitio de integración T-ADN (Schubert et al., 2004). Sin embargo, en el mismo análisis, se observó el silenciamiento del gen cuando más de un cierto número de transgenes idénticos (5-12 copias) estaban presentes en el genoma.

II.K.2. EXPRESIÓN *SuRBHra*

La expresión *SuRBHra* se examinó en las hojas y las frutas Evento EF2-114 y MD2 no transgénica. Las muestras para el análisis incluyeron ARN de un replicado biológico de las hojas y ARN de tres replicados biológicos de las frutas cosechadas a 154 DAF. Los análisis qRT-PCR se realizaron en tres replicados técnicos para cada replicado biológico.

El set de imprimadores/sonda diseñado para este análisis se basó en la secuencia del gen *SuRBHra* introducido. Los imprimadores / sonda no pueden detectar ninguna transcripción *ALS*

endógena en el control MD2, a menos de que haya un gen *SuRBHra* idéntico. Por este motivo, un cambio de plegamiento en la expresión *SuRBHra* en relación al control MD2 no se puede calcular. En lugar de esto, se utilizaron los valores Ct para expresar los datos. Los valores Ct del β -actin se utilizaron como un control positivo para validar el análisis.

Los datos qRT-PCR para las hojas y las frutas se presentan en las Tablas VI-1 y VI-2, respectivamente. Según se observó en la Tabla VI-1 y VI-2, mientras que las transcripciones *SuRBHra* no fueron detectables en las hojas o frutas MD2, la expresión de β -actin sí fue detectable. El valor Ct promedio para el *SuRBHra* en las hojas Evento EF2-114 (Tabla VI-1, 23.93) versus las frutas (Tabla VI-2, 20.18) muestra la naturaleza de la expresión *SuRBHra*.

El nivel de expresión de *SuRBHra* en las frutas también se comparó al nivel de expresión de otro gen altamente expresado en las frutas de piña, el inhibidor de bromelaina (*BRI*), para realizar la cuantificación relativa. Los niveles de expresión de *SuRBHra* parecían ser 25 veces menores en las frutas en relación a la expresión *BRI* en la misma muestra (Tabla VI-3 y VI-4). Por ende, la expresión de *SuRBHra* de bajo nivel podría ser adecuada para convertirse en un marcador seleccionable sin acumularse hasta una concentración significativa en la fruta.

Tabla II-4. Expresión de *SuRBHra* en las hojas de Evento EF2-114

Gene	Replicates	MD2	EF2-114
<i>β-Actin</i>	Rep1	22.69	22.41
	Rep2	22.34	22.34
	Rep3	22.44	22.59
	Ave	22.49	22.45
	Stdv	0.18	0.13
<i>SuRBHra</i>	Rep1	ND	24.03
	Rep2	ND	23.91
	Rep3	ND	23.85
	Ave	ND	23.93
	Stdv	ND	0.09

Tabla II-5. Expresión de *SuRBHra* en frutas de Evento EF2-114

Gene	Replicates	MD2	EF2-114
<i>β-Actin</i>	Rep1	20.43	20.49
	Rep2	20.32	20.37
	Rep3	20.32	20.50
	Rep4	20.69	20.68
	Rep5	20.53	20.75
	Rep6	20.63	20.69
	Rep7	20.84	21.00
	Rep8	20.83	20.80
	Rep9	20.75	20.87
	Ave	20.59	20.68
<i>SuRBHra</i>	Stdv	0.20	0.20
	Rep1	ND	19.81
	Rep2	ND	19.79
	Rep3	ND	20.10
	Rep4	ND	20.10
	Rep5	ND	20.12
	Rep6	ND	20.22
	Rep7	ND	20.47
	Rep8	ND	20.37
	Rep9	ND	20.64
	Ave	ND	20.18
	Stdv	ND	0.28

Tabla II-6. Expresión de *BRI* y *SuRBHra* en las frutas de Evento EF2-114

Sample	Replicates	<i>β-Actin</i>	<i>BRI</i>	<i>SuRBHra</i>
EF2-114	Rep1	20.49	15.24	19.81
	Rep2	20.37	14.76	19.79
	Rep3	20.50	15.26	20.10
	Rep4	20.68	15.73	20.10
	Rep5	20.75	15.68	20.12
	Rep6	20.69	15.33	20.22
	Rep7	21.00	15.49	20.47
	Rep8	20.8	15.55	20.37
	Rep9	20.87	15.71	20.64
	Ave	20.68	15.42	20.18
	Stdv	0.20	0.29	0.28

Tabla II-7. Comparación de la expresión BRI y SuRBHra en frutas de Evento EF2-114

Gen	Muestra	GOI, Ave Ct	Actin, Ave Ct	$\Delta\text{ctGOI}-\beta\text{-Actin}$	$\Delta\Delta\text{Ct}$	Cambio
<i>BRI</i>	EF2-114	15.42	20.68	-5.26	0.00	1.00
<i>SuRBHra</i>		20.18	20.68	-0.50	4.76	0.04

II.K.3. SUPRESIÓN DE *bLcy* Y *eLcy*

El Licopeno es convertido por la licopeno β -ciclase (*bLcy*) y la licopeno ϵ -ciclase (*eLcy*) para producir β -caroteno y α -caroteno, los cuales son precursores del ácido abscísico y la luteína, respectivamente. Para acumular el licopeno en las frutas de piña, los constructos de iARN con genes *bLcy* y *eLcy* bajo el control de promotores BRIp optimizados para frutas se introdujeron en el Evento EF2-114. Se realizó el análisis qRT-PCR de las frutas de Evento EF2-114 y MD2 cosechadas a 106, 131 y 154 DAF para examinar la supresión de *bLcy* y *eLcy*. Las frutas se analizaron en diferentes etapas de desarrollo para capturar el rango de la expresión y por ende, para detectar la supresión de *bLcy* y *eLcy*. Los resultados de los análisis se presentan en la Tabla VI-5 y en la Figura VI-3.

Los datos demuestran que los niveles de expresión del *bLcy* se redujeron en un 86%, 83% y 93% a los 106, 131 y 154 DAF respectivamente, en relación al MD2.

Con base en nuestro análisis Southern, se sabe que el *bLcy* es codificado por un solo gen en el genoma MD2 (Figura V-12, Línea 1). Es evidente a partir de la disminución del *bLcy* en las tres etapas de desarrollo de las frutas del Evento EF2-114 que el constructo de iARN *bLcy* suprimió eficientemente el gen endógeno de manera optimizada para las frutas.

El nivel de expresión de ARN del *eLcy* se redujo en un 88% a 106 DAF y se redujo subsecuentemente en un 68% y un 66% luego de 131 y 154 DAF, respectivamente. Con base en nuestro análisis Southern, *eLcy* parece ser codificado por dos genes en MD2 (Figura V-6, Línea 1). Actualmente, únicamente se conoce la secuencia de uno de los tres genes, la cual se utilizó para la construcción del constructo iARN *eLcy* para el estudio actual. La homología entre la secuencia del gen *eLcy* en nuestro constructo iARN y el otro gen se desconoce y tampoco se sabe cómo alguno de estos dos genes se regula en los niveles temporales y espaciales. La reducción del 68% y el 66% luego de 131 y 154 DAF puede ser causada por las diferencias en las secuencias de nucleótidos entre los dos genes, afectando la eficacia de la supresión.

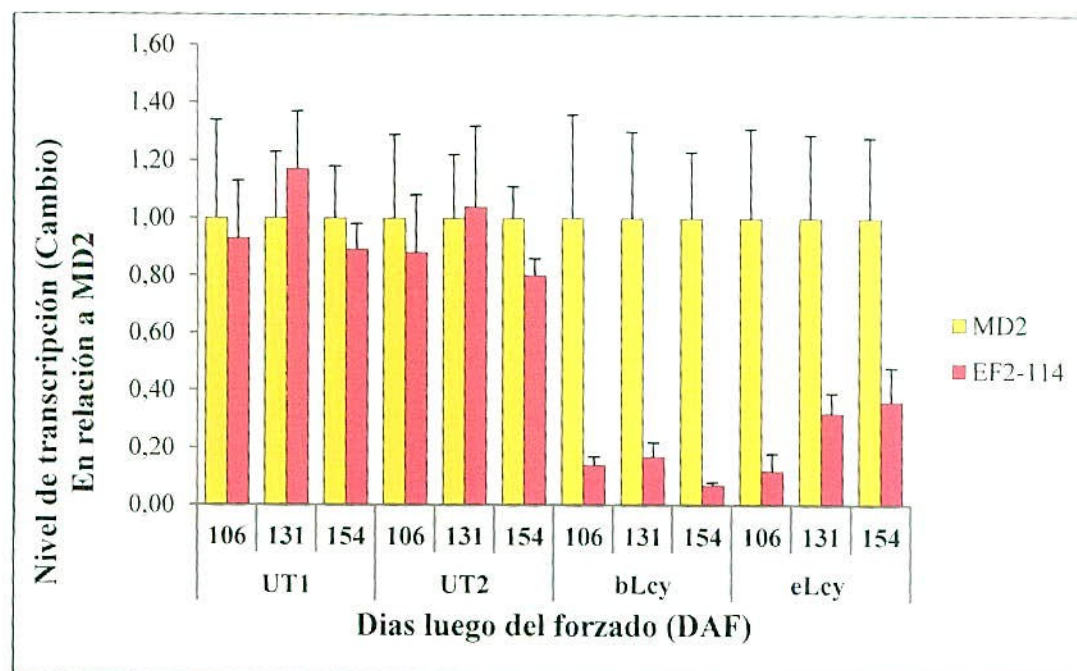
La expresión de los genes de piña endógenos *UT1* y *UT2* y la supresión eficiente de la expresión de los genes *bLcy* y *eLcy* en el Evento EF2-114 produjo la acumulación de licopeno (promedio de 21 ppm) y una reducción de tres veces la cantidad de β -caroteno (de 28.1 IU/100 g en MD2 a 8.9 IU/100 g en Evento EF2-114) en las frutas. Se ha reportado la supresión eficiente de *bLcy* y

eLcy por medio de tecnología iARN, produciendo un mayor contenido de licopeno en tomates transgénicos (Ma et al., 2011). En este caso, los genes *bLcy* y *eLcy* de tomate estaban en dos plásmidos de transformación separados. Ronen et al. (2000) demostraron un aumento en el contenido de β -caroteno y una disminución en el contenido de licopeno en las líneas de tomate transgénico por medio de la sobreexpresión del gen *bLcy* de tomate. Nuestros resultados de qRT-PCR de las frutas del Evento EF2-114 concuerdan con estos reportes.

Tabla II-8. Expresión/supresión relativa de *UT1*, *UT2*, *bLcy* y *eLcy*

Gene	DAF	MD2	STDV-MD2	EF2-114	STDV-114
<i>UT1</i>	106	1.00	0.34	0.93	0.20
	131	1.00	0.23	1.17	0.20
	154	1.00	0.18	0.89	0.09
<i>UT2</i>	106	1.00	0.29	0.88	0.20
	131	1.00	0.22	1.04	0.28
	154	1.00	0.11	0.80	0.06
<i>bLcy</i>	106	1.00	0.36	0.14	0.03
	131	1.00	0.30	0.17	0.05
	154	1.00	0.23	0.07	0.01
<i>eLcy</i>	106	1.00	0.31	0.12	0.06
	131	1.00	0.29	0.32	0.07
	154	1.00	0.28	0.36	0.12

Figura II-12. Expresión/supresión relativa de *UT1*, *UT2*, *bLcy* y *eLcy*



H.K.4. SUPRESIÓN DEL *flACC3'*

Para reducir la floración natural y precoz en la piña, el constructo de iARN con la secuencia específica para el meristem del *flACC3'* se introdujo en MD2. En el plásmido pHCW*flACC3'*-2, la expresión de la estructura horquillada de *flACC3'* está bajo el control de transcripción del promotor constitutivo Ubpp. Aunque un promotor constitutivo es responsable de la expresión del constructo iARN, la secuencia *flACC* es específica para el ACS meristem (*flACC3'*) y por ende, se puede esperar que su expresión reduzca la expresión del gen ACS endógeno específico.

En los análisis Southern, no hemos observado el fenotipo de control de floración del Gen *flACC* introducido en el genoma del Evento EF2-114 (Figura V-8, Línea 2), en las evaluaciones de campo del Evento EF2-114. También se hicieron varios intentos para evaluar la expresión de *flACC3'* en los tejidos meristemáticos de MD2 y de Evento EF2-114 por medio de qRT-PCR (Los datos no se presentan). Los valores Ct obtenidos en estos análisis fueron >35 y por ende, los niveles de expresión estuvieron bajo el umbral de detección. Sin la expresión detectable del *flACC3'* en MD2, no fue posible valorar el efecto del iARN en el control de floración del Evento EF2-114.

H.L. REFERENCIAS

- Agarwal S, Zhang X, Lu Z, Zhao H, Tamburin JM, Yan J, Cai H, Diasio RB, Habus I, Jiang Z, Iyer RP, Yu D and Zhang R. 1995. Absorption, tissue distribution and *in vivo* stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. *Biochem. Pharmacol.* 50:571-576.
- Ahrazem O, Ibáñez MD, López-Torrejón G, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D and Salcedo G. 2005. Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137(3):201-10.
- Ahrazem O, Ibáñez MD, López-Torrejón G, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D and Salcedo G. 2006. Orange germin-like glycoprotein Cit s 1: an equivocal allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 139:96-103.
- Akhtar S 2009. Oral delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *J. Drug Target.* 17:491-495
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25:1322-1326.
- Busch M, Seuter A and Hain R. 2002. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 128:439-453.

- Butaye KM, Goderis JJ, Wouters PF, Poes JM, Delaure SL, Brockaert WF, Depicker A, Cammue BP and De Bolle MF. 2004. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J.* 39:440-449.
- Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Chen J and Zhang W. 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.* 19:777-786.
- Chuang C-F and Meyerowitz EM. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4985-4990.
- Codex Alimentarius Commission. 2003. Proposed draft annex on the assessment of possible allergenicity of the draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived recombinant ADN plants. Joint FAO/WHO Food Standard Program, Appendix IV: pp. 57-60.
- Cogoni C and Macino G. 2000. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:638-643.
- Creason GL and Chaleff RS. 1988. A second mutation enhances resistance of a tobacco mutant to sulfonylurea herbicides. *Theor. Appl. Genet.* 76:177-182.
- Crespo JF, Retzek M, Foetisch K, Sierra-Maestro E, Cid-Sanchez AB, Pascual CY, Conti A, Feliu A, Rodriguez J, Vieths S and Scheurer S. 2006. Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:282-290.
- Falco SC and Dumas KD. 1985. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *Genetics* 109:21-35.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy, pp. 22-25.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. 1998. Potent and specific genetic inheritance by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fraser PD and Bramley PM. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43(3):228-265.

- Fray R, Wallace A, Fraser P, Valero D and Hedden P. 1995. Constitutive expression of a fruit *fitoeno sintasa* gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* 8:693-701.
- Fuchs M and Gonsalves D. 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Ann. Rev. Phytopath.* 45:173-202.
- Friden P, Donegan J, Mullen J, Tsui P, Freundlich M, Eoyang L, Weber R and Silverman PM. 1985. The *ilvB* locus of *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding both subunits of acetohidroxiácido sintasa I. *Nucl. Acids Res.* 13:3979-3993.
- Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 132:36-43.
- Gavilano LB, Coleman NP, Burnley LE, Bowman ML, Kalengamaliro NE, Hayes A, Bush L and Siminszky B. 2006. Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced normicotine content. *J. Agric. Food Chem.* 54:9071-9078.
- Gupta R, Jung E and Brunak S. 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
- Hamilton AJ and Baulcombe DC. 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Hartnett ME, Chui CF, Mauvais CJ, McDevitt RE, Knowlton S, Smith JK, Falco SC and Mazur BJ. 1990. Herbicide-resistant plants carrying mutated acetolactate synthase genes. *In: Managing Resistance to Agrochemicals. ACS Symp. Ser.* 421:459-473.
- Henikoff S and Henikoff JG. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919.
- Hirai S and Kodama H. 2008. iARN vectors for manipulation of gene expression in higher plants. *The Open Plant Science Journal* 2:21-30.
- Hirschi KD. 2012. New foods for thought. *Trends Plant Sci.* 17:123-125.
- Hofvander P, Persson PT, Tallberg A, Tallberg T, Wilkstrom O. 2004. Genetically engineered modification of potato to form amylopectin starch. Patent 6784338, USA.
- Ikoma Y, Komatsu A, Kita M, Ogawa K, Omura M, Yano M and Moriguchi T. 2001. Expression of a *fitoeno sintasa* gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* 111:232-238.

- Jackson AL and Linsley PS. 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:57-67.
- Jain KK. 2008. Stability and delivery of RNA via the gastrointestinal tract. *Curr. Drug Deliv.* 5:27-31.
- Kusaba M, Miyahara K, Lida S, Fukuoka H, Takano T, Sassa H, Nishimura M and Nishio T. 2003. *Low glutenin content 1*: A dominant mutation that suppresses the *Glutelin* multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* 15:1455-1467.
- LaRossa RA and Schloss JV. 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259(4):8753-8757.
- Lee YS and Carthew RW. 2003. Making a better iARN vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30:322-329.
- Lee KY, Townsend J, Tepperman J, Black M, Chui CF, Mazur B, Dunsmuir P and Bedbrook J. 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM and Dougherty WG. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants. Implication for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749-1759.
- López-Torrejón G, Ibáñez MD, Ahrazem O, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D and Salcedo G. 2005. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy* 60(11):1424-9.
- Ma C, Ma B, He J, Hao Q, Lu X and Wang L. 2011. Regulation of carotenoid content in tomato by silencing of lycopene β/ϵ -cyclase genes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29:117-124.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P and Welsch R. 2009. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS ONE* 4(7): e6373.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP and Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated iARN impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25:1307-1313.
- Marmioli N, Agrimonti C, Visioli G, Colauzzi G, Guarda G and Zuppin A. 2000. Silencing of G1-1 and A2-1 genes. Effects on general plant phenotype and on tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L. *Potato Res.* 43:313-323.

- Mazur BJ, Chui CF and Smith JE. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol.* 85:1110-1117.
- Mazur BJ and Falco SC. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:441-470.
- Mello CC and Conte Jr D. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 432:338-342.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA and Matzke AJ. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19:5194-5201.
- Misaki A. 1999. The origin and the development process of Kisyu Arida Mikan (Arida mandarin). [English abstract] *Wakayama Economic Review* 292:97-118.
- Montgomery MK and Fire A. 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.* 14:255-258.
- Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M and Botella JR. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J. Expt. Bot.* 56 (409):101-112.
- Ong WD, Voo LY and Kumar VS. 2012. *De novo* assembly, characterization and functional assembly of pineapple fruit transcriptome through massively parallel sequencing. *PLoS ONE* 7(10): e46937. doi:10.1371/journal.pone.0046937.
- Panstruga R, Kim MC, Cho MJ, Schulze-Lefert P. 2003. Testing the efficiency of dsRNA constructs *in vivo*: A transient expression assay based on two fluorescent proteins. *Mol. Biol. Rep.* 30:135-140.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 12:1484-1495.
- Paszkowski J and Whitham SA. 2001. Gene silencing and ADN methylation processes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:123-129.
- Pearson WR and Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.
- Piccin A, Salameh A, Benna C, Sandrelli F, Mazzotta G, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CR and Costa R. 2001. Efficient and heritable functional knock-out of an adult

- phenotype in *Drosophila* using a GA14-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* 29:E55.
- Que Q, Wang H-Y, English JJ and Jorgensen RA. 1997. The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgene are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9:1357-1368.
- Reith M and Munholland J. 1995. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7:333-335.
- Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa C, Schuch W and Bramley PM. 2000. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat. Biotechnol.* 18:666-669.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J. 2000. An alternative pathway to beta-caroteno formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(20):11102-11107.
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S and Schmidt R. 2004. Silencing in *Arabidopsis* T-ADN transformants: the predominant role of a gene-specific RNA silencing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16:2561-2572.
- Shaner D, Anderson P and Stidham M. 1984. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohidroxiácido sintasa. *Plant Physiol.* 76:545-546.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JN and Kooter JM. 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr. Biol.* 11:436-440.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG and Waterhouse PM. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319-320.
- Song J, Braun G, Bevis E and Doncaster K. 2006. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis* 27:3144-3151.
- Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PM and Green AG. 2002. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* 129:1723-1731.
- Tabara H, Grishok A and Mello CC. 1998. Reverse genetics: iARN in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282:430-431.

- Tada Y, Akagi H, Fujimura T, Matsuda T. 2003. Effect of an antisense sequence on rice allergen comprising multigene family. *Breed. Sci.* 53:61-67.
- Tan S, Evans R and Singh B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30:195-204.
- Tuteja JH, Clough SJ, Chan WC and Vodkin LO. 2004. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* 16:819-835.
- USDA ARS. 2013. *World Economic Plants* report from USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxconlist.pl> (accessed September 25, 2013).
- Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC and Vernihettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16:651-659.
- Vaucheret H and Chupeau Y. 2012. Ingested plant miRNAs regulate gene expression in animals. *Cell Res.* 22:3-5.
- Whyard S, Singh AD and Wong S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:824-832.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG and Waterhouse PM. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27:581-590.
- WHO/IUIS. 2013. World Health Organization – International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee. Systematic allergen database. <http://allergen.org>. (accessed September 18, 2013).
- Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y et al., 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 22:107-126.
- Zhang Y, Wiggins BE, Lawrence C, Petrick J, Ivashuta S and Heck G. 2012a. Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics* 13:381.

III. VALORACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL EVENTO EF2-114

Las valoraciones de seguridad de las cosechas de biotecnología generalmente incluyen comparaciones de la composición de los tejidos comestibles de la cosecha de MG a la de las contrapartes cosechadas convencionalmente (Codex Alimentario, 2003). Cuando están disponibles, las valoraciones de composición se realizan utilizando los principios y los analitos descritos en los documentos de consenso de la OECD para la cosecha pertinente. Sin embargo, a diferencia de los commodities más importantes, ni la OECD, ni ILSI han publicado un documento de consenso o base de datos sobre la composición de la piña. Por ende, para esta valoración, se consultó la literatura científica publicada para alimentos, la FDA y Health Canada para desarrollar un conjunto de parámetros de composición para el análisis comparativo para el Evento EF2-114 y su contraparte convencional, MD2.

La información suministrada en esta sección también se refiere a los factores relevantes en los lineamientos de plantas del Códex, Sección 4, párrafos 44, 45, 46, y 47 para la valoración de la composición, los metabolitos y los efectos del procesamiento de alimentos.

III.A. NUTRIENTES DE LA PIÑA

La fruta de la piña es deliciosa, saludable y nutritiva; tiene vitaminas, minerales, fibra y enzimas que son buenas para el sistema digestivo y ayuda a mantener el peso ideal y una nutrición balanceada. La piña tiene cantidades mínimas de grasa (grasa saturada) y sodio y es una fuente adecuada de vitamina C, potasio y fibra (Purseglove, 1972; Morton, 1987; Mateljan, 2007). La piña puede comerse cruda o se puede utilizar para cocinar. La parte comestible de la fruta de la piña (60% de la fruta fresca) está compuesta por 85% agua, 0.4% proteína, 14% azúcar, 0.1% grasa y 0.5% fibra (Purseglove, 1972). El contenido de azúcar varía considerablemente durante el proceso de maduración y depende de quien la cultivó. La fruta de la piña contiene antioxidantes, principalmente vitaminas A y C, las cuales se piensa que reducen el daño oxidativo causado por los radicales libres y los metales quelantes. Adicionalmente contiene el complejo de enzimas bromelaina, el cual se ha pensado que ayuda en la digestión (Tochi et al., 2008).

La Tabla VII-1 ilustra el contenido de nutrientes de las variedades de piña Smooth Cayenne y MD2, en comparación con las manzanas, naranjas y bananos (USDA ARS, 2009; Health Canada, 2008).

Tabla III-1. Composición de nutrientes de la piña fresca

Nutriente (en 100 g de pulpa comestible)	Unidad	Piña: Smooth Cayenne, USDA ¹	Piña: MD2		Manzana		Naranja		Banano	
			USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹
Proporción no comestible		42% (centro, corona, cortes)	49% (centro, corona, cortes)	NR ²	23% (centro, tallo, cáscara)	NR ²	27% (cáscara, semillas)	NR ²	36% (cáscara)	NR ²
Agua	g	87	86	NR ²	87	NR ²	87	NR ²	75	NR ²
Energía	kJ	190	215	212	200	217	197	197	371	372
Proteína	g	0.55	0.53	Tc ¹	0.27	Tc ¹	0.94	0.76	1.09	0.85
Lípidos totales (grasa)	g	0.13	0.11	Tc ¹	0.13	Tc ¹	0.12	Tc ¹	0.33	Tc ³
Carbohidrato	g	11.82	13.5	13.41	12.76	13.77	11.75	11.45	22.84	22.88
Fibra (total)	g	NR ²	1.4	1.3	1.3	1.9	2.6	1.8	2.4	1.8
Total de azúcar	g	8.29	10.32	NR ²	10.1	NR ²	9.35	NR ²	12.23	NR ²
Sacarosa	g	4.59	6.47	NR ²	0.82	NR ²	NR ²	NR ²	2.39	NR ²
Glucosa (dextrosa)	g	1.76	1.7	NR ²	3.25	NR ²	NR ²	NR ²	4.98	NR ²
Fructosa	g	1.94	2.15	NR ²	6.03	NR ²	NR ²	NR ²	4.85	NR ²
Almidón	g	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	5.38	NR ²
Calcio	mg	13	13	13	5	6	40	40	5	5
Hierro	mg	0.25	0.28	0.24	0.07	0.14	0.1	0.08	0.26	0.25
Magnesio	mg	12	12	12	4	5	10	10	27	27
Fósforo	mg	9	8	9	11	11	14	14	22	22
Potasio	mg	125	108	107	90	107	181	181	358	358
Sodio	mg	1	1	1	0	1	0	0	1	1
Zinc	mg	0.08	0.12	NR ²	0.05	NR ²	0.07	NR ²	0.15	NR ²
Cobre	mg	0.081	0.113	NR ²	0.031	NR ²	0.045	NR ²	0.078	NR ²
Manganeso	mg	1.593	0.818	NR ²	0.038	NR ²	0.025	NR ²	0.27	NR ²
Vitamina C (ácido ascórbico total)	mg	16.9	56.4	56.1	4	4.3	53.2	53.4	8.7	8.5
Vitamina B1 Tiamina	mg	0.078	0.08	NR ²	0.019	NR ²	0.087	NR ²	0.031	NR ²
Vitamina B2 Riboflavina	mg	0.029	0.033	NR ²	0.028	NR ²	0.04	NR ²	0.073	NR ²
Vitamina B3 Niacina	mg	0.47	0.507	NR ²	0.091	NR ²	0.282	NR ²	0.665	NR ²
Ácido pantoténico	mg	0.193	0.217	NR ²	0.071	NR ²	0.25	NR ²	0.334	NR ²
Vitamina B6	mg	0.106	0.114	NR ²	0.037	NR ²	0.06	NR ²	0.367	NR ²

89
54

Nutriente (en 100 g de pulpa comestible)	Unidad	Piña: Smooth Cayenne, USDA ¹	Piña: MD2		Manzana		Naranja		Banano	
			USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹	USDA ¹	HC ¹
Folato	mcg	11	19	20	0	0	30	30	20	20
Colina	mg	5.6	5.4	NR ²	3.4	NR ²	8.4	NR ²	9.8	NR ²
Vitamina A	IU	52	57	NR ²	38	NR ²	225	NR ²	64	NR ²
β -Caroteno	mcg	31	34	34	17	27	71	71	26	26
Vitamina E (α -tocoferol)	mg	NR ²	0.02	NR ²	0.05	NR ²	0.18	NR ²	0.1	NR ²
Vitamina K (filoquinona)	mcg	0.7	0.7	NR ²	0.6	NR ²	0	NR ²	0.5	NR ²

1 USDA = USDA ARS, 2009; HC = Health Canada, 2008

2 Te = Traza

3 NR = No reportado

III.B. COMPOSICIÓN DE NUTRIENTES DEL EVENTO EF2-114

El Evento EF2-114 se ha creado genéticamente para acumular licopeno en las frutas por medio de la sobre-expresión de un gen de fitoeno sintasa y la supresión de los genes licopeno β -ciclase y licopeno ϵ -ciclase. La manipulación genética de la vía de biosíntesis carotenoides se ha reportado en las plantas para alimentos y las no utilizadas como alimentos incluyendo arroz, papa, tomate, zanahoria, canola, flores *Lotus japonicus*, tabaco y *Arabidopsis* (Giuliano et al., 2008). Ma et al. (2011) reportaron que la supresión de los genes licopeno β -ciclase y licopeno ϵ -ciclase en tomate produjo un aumento de siete veces la acumulación de licopeno y una reducción significativa en β -caroteno y luteína.

Los efectos pretendidos y no pretendidos de los genes introducidos se evaluaron por medio de la comparación de la composición de nutrientes de las frutas del Evento EF2-114 y MD2. Para lo anterior, las plantas se cultivaron bajo condiciones climáticas idénticas (Anexo A sección A.2) y el cultivo se realizó con un diseño de bloque totalmente aleatorizado con tres replicados con números diferentes, compuestos de un total de 2,541 plantas de Evento EF2-114 (606+1,477+458) y 145 plantas MD2 (25+61+59). Las frutas en la misma etapa de maduración (color de la cáscara) y el mismo tamaño se cosecharon el 22 de octubre del 2013, debido a que las diferentes etapas de maduración afectan cierta parte de la composición nutricional de las frutas (Ramsaroop and Saulo, 2007; Shamsudin et al. 2007). Se cosechó un total de 45 plantas de Evento EF2-114 aceptables (i.e., sin daños) y 33 frutas MD2 aceptables de manera aleatoria de todos los replicados y se enviaron utilizando un transportista express a EUA para que fuesen analizadas (ABC Research Laboratories, Gainesville, FL). En ABC Research Laboratories, 18 frutas de Evento EF2-114 y 18 frutas de MD2 se seleccionaron aleatoriamente para los análisis de composición (ver adicionalmente el Anexo A sección A.1 y el Anexo E para más detalles).

Se evaluó un total de 19 analitos en las frutas de Evento EF2-114 y MD2, incluyendo licopeno, β -caroteno, α -caroteno, luteína, proximates, azúcares, diversos aminoácidos, potasio y vitamina

C. Estos componentes se seleccionaron para el análisis debido a que 1) los proximates se consideran como medidas importantes de la calidad de las frutas y la nutrición, 2) las frutas con azúcar son factores importantes para el sabor, la nutrición y la dulzura, 3) algunos amino ácidos involucrados en la biosíntesis de los aminoácidos esenciales de cadena ramificada (metionina, leucina, isoleucina, y valina) potencialmente pueden verse afectados por el producto del gen *SuRBHra* (Van Dyk et al., 1998), y 4) la piña es una excelente fuente de vitamina C y una muy buena fuente de potasio. Adicionalmente, el efecto que se pretende obtener con la modificación genética es la acumulación de licopeno en la pulpa de la fruta. Por lo tanto, los componentes de la biosíntesis de carotenoides se analizaron para determinar los efectos de los genes introducidos sobre la proporción relativa del licopeno, β -caroteno, α -caroteno y la luteína.

La composición de nutrientes del Evento EF2-114 se evaluó a través del análisis de las frutas producidas bajo condiciones idénticas a las frutas MD2. MD2, la variedad parental del Evento EF2-114, cuenta con un historial genético idéntico al Evento EF2-114 excepto por los genes introducidos y por ende, es una variedad apropiada para la comparación de la composición de nutrientes. Debido a que MD2 es la variedad de piña fresca predominante en el mercado con aproximadamente un 98% de participación de mercado en Norteamérica, ninguna otra variedad de piña fresca en el mercado se incluyó en este estudio comparativo.

Los análisis de los nutrientes clave demuestran que el Evento EF2-114 es sustancialmente equivalente al MD2 con las siguientes excepciones: Las frutas del Evento EF2-114 acumulan licopeno y contienen menores cantidades de β -caroteno debido a la modificación genética; y contienen mayores niveles de potasio en comparación con la fruta MD2 ($P < 0.001$). Se notaron diferencias menores entre las frutas del Evento EF2-114 y las frutas MD2 con respecto a otros componentes de nutrientes (ceniza, carbohidratos, humedad, sacarosa, vitamina C, leucina) ($P < 0.01$), sin embargo, estas diferencias están entre el rango reportado de los nutrientes en las variedades de piña y se consideran como biológicamente insignificantes.

Los resultados de los análisis de composición de nutrientes para las frutas del Evento EF2-114 y las frutas de control MD2 se resumen en las Tablas VII-2 y VII-3 y en la Figura VII-1. Los análisis han demostrado que no hay diferencias significativas en los nutrientes seleccionados para la comparación en las frutas del Evento EF2-114 y las frutas MD2, excepto por licopeno, β -caroteno y potasio ($P < 0.001$).

Carotenoides (licopeno, β -caroteno, α -caroteno, luteína): La concentración de licopeno en las frutas del Evento EF2-114 varió entre 14.3 y 32.9 ppm (prom. 21.3 ppm). La acumulación de licopeno resultó en la producción de pulpa de color rosado/rojo en las frutas del Evento EF2-114 (Figura VII-2). Según nuestro conocimiento, no se han dado reportes sobre la presencia de licopeno en ningún tipo de fruta de piña. Las variedades tradicionales, Champaka (CH) y Smooth Cayenne (SC), son similares a la MD2 con respecto a la composición de nutrientes excepto por una menor concentración de vitamina C. La USDA (2013a y 2013b) reportó que la cantidad de licopeno en MD2, CH, y SC es de 0 ppm y Health Canada (2008) también reportó la cantidad de

licopeno en los cubos de piña como 0 ppm (Tabla VII-4). Charoensiri et al. (2009) reportó la cantidad de licopeno en la piña Sriracha, una variedad del sureste asiático, como 0 ppm. Las concentraciones de licopeno en las frutas del Evento EF2-114 están dentro del rango de licopeno producido en otros alimentos con un historial de uso seguro. Por ejemplo, las concentraciones de licopeno son 26 ppm para el tomate (calculado como $4631 \mu\text{g}$ en $180 \text{ g} = 26 \text{ ppm}$), 45 ppm para la sandía y 14 ppm para la toronja (USDA, 2013c, Release 25, NDB no. 11529, 9326, 9112, respectivamente). Health Canada (2008) también reportó las mismas concentraciones de licopeno para estos tres productos.

El valor promedio para la concentración de β -caroteno en el Evento EF2-114 fue 8.9 IU/100 g (o $5.34 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), que es significativamente menor que el valor promedio observado en MD2 ($28.1 \text{ IU}/100 \text{ g} = 16.86 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). (Tomar en cuenta que 1 IU de β -caroteno = $0.6 \mu\text{g}$ de β -caroteno, para la comparación con otros cultivos mencionados a continuación). Este efecto es predecible debido a que la conversión del licopeno a β -caroteno disminuyó con la supresión de la licopeno β -ciclase (ver la Sección IV.A.1 para la estrategia que se utilizó para la manipulación de la vía de biosíntesis de carotenoides). Para la comparación, la base de datos de la USDA reportó la concentración de β -caroteno en MD2 y CH/SC como 34 IU/100 g y 31 IU/100 g, respectivamente (USDA, 2013a; USDA, 2013b; Tabla VII-4) y Health Canada reporta la concentración de β -caroteno en los cubos de piña como 34 IU/100 g (Health Canada, 2008). Charoensiri et al. (2009) reportaron la cantidad de β -caroteno a menos del nivel de detección para la piña Sriracha.

En general, la piña no es una fuente importante de β -caroteno (pro-vitamina A). El camote, la zanahoria, el melón y el albaricoque producen 9444, 8285, 2020 y 1094 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de β -caroteno, respectivamente, de acuerdo con el reporte de la USDA (2013d) y 9382, 8225, 2009 y 1094 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de β -caroteno, respectivamente, de acuerdo con el reporte de Health Canada (2008). Por ende, no se espera que una reducción en el contenido de β -caroteno en las frutas del Evento EF2-114 tenga un impacto significativo sobre el consumo de β -caroteno (pro-vitamina A).

El contenido de α -caroteno también se midió en las frutas de MD2 y del Evento EF2-114, sin embargo, la concentración estaba por debajo del nivel de detección ($<10 \text{ IU}/100 \text{ g}$) (Tabla VII-2, nota al pie de página, los datos no se presentan). La base de datos de la USDA (USDA, 2013a; USDA, 2013b; USDA, 2013f) reporta la concentración de α -caroteno en MD2, CH, y SC como 0 IU/100 g.

En general, la concentración de luteína es extremadamente baja en la piña. La base de datos de la USDA reporta que la concentración de luteína es extremadamente baja en la piña. La base de datos de la USDA ha reportado que la concentración de luteína fue cero para todas las variedades, incluyendo MD2, CH y SC (USDA, 2013a; USDA, 2013b; USDA, 2013c; Tabla VII-4). Para comparación, los alimentos con alto contenido de luteína / zeaxantina son repollo chino ($19,700 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), espinaca ($15,690 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), calabaza amarilla ($2,248 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), maíz

dulce (949 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), pimienta (431 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), mandarina (163 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y naranja (129 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) (USDA, 2013e).

La luteína es producida por medio de la conversión de α -caroteno (Hirschberg, 2001). En el Evento EF2-114, debido a que la conversión de licopeno a α -caroteno se disminuye por medio de la supresión de la licopeno ϵ -ciclase (ver la Sección IV.A.1), teníamos curiosidad sobre si la concentración de luteína en realidad se reduce en el Evento EF2-114 en comparación con el MD2 (ver también la justificación que se presentó anteriormente). Con los análisis que utilizamos, detectamos luteína en concentraciones muy reducidas (dos frutas del Evento EF2-114 tenían 1.5 y 1.8 y dos MD2 tenían 2.2 y 2.5 μg de luteína en 100 g de fruta). Anteriormente habíamos cubierto el contenido de luteína en algunas muestras de otros eventos y obtuvimos resultados similares. La menor concentración de luteína en el Evento EF2-114 fue predecible.

Con respecto a los cambios observados en la acumulación de carotenoides en nuestros estudios, Ma et al. (2011) reportó resultados similares, en este reporte la supresión de los genes licopeno β -ciclase y licopeno ϵ -ciclase en el tomate aumentaron el licopeno y redujeron la acumulación de β -caroteno y luteína.

Potasio: La concentración de potasio fue significativamente mayor en las piñas del Evento EF2-114 (156 mg/100 g) que en MD2 (129 mg/100 g); el valor promedio para las piñas del Evento EF2-114 estuvo fuera del rango de los valores medidos para las piñas MD2. Un valor mayor de potasio en las piñas Evento EF2-114 puede considerarse como deseable.

La concentración de potasio es variable entre las variedades de piña. Por ejemplo, la USDA reportó (USDA, 2013a, USDA, 2013b) que las piñas MD2 producen 108 mg/100 g y las piñas CH/SC 125 mg/100 g de potasio (Tabla VII-4) y en otro reporte, todas las variedades producen 109 mg/100 g de potasio (USDA, 2013g). Health Canada (2008) reportó que los cubos de piña producen 107 mg/100 g de potasio (Tabla VII-4). La FAO (2012) reportó la producción de 205 mg/100 g en las frutas de piña de África Occidental. Othman (2011) reportó que la variedad de fruta de piña Mbezi (cultivada en Tanzania) produce 411 mg/100 g-de peso de la fruta de piña. De los cuatro macro elementos (calcio, sodio, magnesio, potasio) y metales (cromio, manganeso, zinc, hierro, cobre, aluminio, cadmio, plomo) medidos, el potasio fue el elemento mineral predominante en las frutas de piña. El contenido de potasio de las frutas de piña Mbezi medido fue mayor que los contenidos de potasio para las frutas del Este de África reportados por West, et al. (1988) i.e. 150 – 280 mg/100 g-peso de la fruta.

La diferencia para la cantidad de potasio que se observó entre las frutas del Evento EF2-114 y las frutas MD2 puede contribuir a los factores ambientales y tal vez, a la absorción de potasio de la tierra. En los tomates se ha dado una correlación entre el contenido de licopeno y el contenido de potasio en la fruta. Adicionalmente, el contenido de licopeno aumentó linealmente con el aumento en el nivel de potasio en la solución de nutrientes de la planta (Serio et al. 2007). Taber et al. (2008) descubrió que la concentración de potasio en las frutas del tomate con alto

contenido de licopeno 'Fla. 8153' estaba significativamente ($P < 0.01$) correlacionado a los carotenoides de la fruta, indicando un rol posible de la nutrición del potasio en el licopeno y reduciendo el β -caroteno en las frutas. Por ende, es posible que la acumulación del licopeno en las frutas del Evento EF2-114 aumentó (está correlacionado con el mayor) nivel de potasio en la fruta.

Los tipos y las fuentes de fertilizadores de potasio afectan la calidad, los nutrientes y los atributos post-cosecha de la piña y de otras frutas (Quaggio et al. 2009; Ganeshamurthy et al. 2011). Los sólidos solubles totales y el contenido de ácido ascórbico de la pulpa de la fruta de piña 'Smooth Cayenne' variaron significativamente como una función de las tasas de potasio y las fuentes. La acidez titulable total aumentó debido a la aplicación del potasio. El uso del sulfato de potasio resultó en una mejor razón de azúcar/ácido en la fruta, especialmente en mayores tasas de potasio. La firmeza de las frutas disminuyó luego del mayor periodo de almacenaje y este efecto fue mayor sin la aplicación del potasio. Las características post-cosecha de las frutas de piña se vieron más afectadas por las tasas de potasio que por las fuentes de potasio (Quaggio et al. 2009).

Es necesaria una mayor tasa de fertilizador de potasio para lograr no solamente una mayor producción total de frutas, pero también el mayor porcentaje de frutas apropiadas para la comercialización y el mantenimiento de buena calidad con un alto contenido de minerales. El potasio aplicado tiene influencia sobre el tamaño de las frutas, la apariencia, el color y la aceptación de los consumidores como por ejemplo el aroma y el sabor de la fruta. La falta de o la deficiencia de potasio produce plantas que son altamente susceptibles a enfermedades y pestes, así como otros estreses ambientales. Los efectos positivos adicionales del potasio incluyen un alto contenido de jugo, alto contenido de vitamina C, uniformidad y aceleración de la maduración de las frutas y resistencia a daños o problemas físicos durante el envío y el almacenaje (Ganeshamurthy et al. 2011).

En general, las piñas que se consumen en EUA no son fuentes importantes de potasio; el consumo anual de piña en EUA está limitado a ~6 lb (~3 lbs de pulpa) per cápita (Figura II-4). Agri-Food Trade Service (2012) reportó que el consumo de pila en EUA fue en promedio de 2.2 kg per cápita durante el 2006-2011 (Tabla VII-5). Luego calculamos cuanta contribuye la piña y las otras frutas al consumo diario de potasio para los adultos (en base a los valores de consumo diario y el contenido de potasio para cada fruta). Por ende, la piña tiene un rol limitado como una fuente de potasio en EUA con un promedio de 0.1% de la ingesta diaria adecuada para un adulto (Tabla VII-6). Las concentraciones de potasio en el banano y los frijoles blancos, las mayores reportadas para un cultivo, son 358 mg/100 g y 561 mg/100 g, respectivamente (USDA, 2013g).

Vitamina C: La vitamina C es un componente de nutrientes importante para la piña. En este análisis, el valor promedio para la concentración de vitamina C fue menor en las piñas del Evento EF2-114 en comparación con el de las piñas MD2 (40.3 mg/100 g vs. 46.8 mg/100 g). Los niveles de vitamina C para las piñas del Evento EF2-114 y las piñas MD2 estuvieron dentro

de los rangos observados normalmente en MD2 producidas comercialmente. Por ejemplo, aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$) para la vitamina C (Tabla VII-2), las diferencias fueron pequeñas y los valores promedio estuvieron dentro de los rangos de valores reportados para las piñas MD2.

Las piñas de MD2 y del Evento EF2-114 exhiben un contenido similar de ácido ascórbico cuando las mediciones se realizaron utilizando muestras de un mayor tamaño y durante múltiples años (ver el Anexo F, Calidad Interna del Evento EF2-114). En otro experimento realizado entre Julio del 2011 y Julio del 2013, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ácido ascórbico entre las piñas del Evento EF2-114 y las piñas MD2 (ver el Anexo G, Características de Plantas y Frutas del Evento EF2-114).

La concentración de Vitamina C en la piña fluctúa dramáticamente. Quaggio et al. (2009) demostró que el potasio es el nutriente más necesario para la cosecha de la piña y las tasas y fuentes del fertilizador de potasio podrían afectar las concentraciones de ácido ascórbico en las frutas SC. Pardio Sedas et al. (1994) demostró una pérdida significativa de Vitamina C en la piña a altas temperaturas de 30-40 °C. Cock and Leal (2012) demostraron que la concentración de Vitamina C de 'Perola' (P) aumenta en relación a la edad de la planta en el momento de la inducción de la floración (número de meses luego del cultivo), mientras que el contenido de vitamina en SC se mantuvo constante luego de los diferentes tiempos de inducción de floración. Esto fue consistente con los resultados obtenidos por Cock et al. (2010) para P, SC y Favo De Mel, mientras que para Jupí cultivar se encontró una relación positiva entre la edad de la planta en el momento de la inducción de la floración y la concentración de vitamina C. En nuestros análisis, las frutas probadas por ABCR se indujeron a la floración 13 meses luego de su cultivo, mientras que para las plantas en el experimento con el cultivo del 19 de Julio (Anexo G) la floración se indujo 18-18.5 meses luego del cultivo. Estas diferencias de edad y la diferencia en el tiempo de cosecha (Junio/Julio vs. Octubre) podrían ser responsables de diferencias en las concentraciones de vitamina C entre las piñas MD2 y las piñas del Evento EF2-114.

Lee and Kader (2000) reportaron que el contenido de vitamina C en las frutas y vegetales pueden verse influenciadas por distintos factores como:

1. Diferencias de genotipo.
2. Condiciones climáticas previas a la cosecha (i.e., temperatura e intensidad de luz durante la temporada de crecimiento, mientras mayor sea la intensidad de la luz durante la temporada de crecimiento, mayor será el contenido de vitamina C en la pulpa de la planta).
3. Prácticas de cultivo (i.e., aplicación de fertilizadores y agroquímicos e irrigación. Las altas tasas de aplicación de fertilizantes de nitrógeno tienden a disminuir el contenido de vitamina C en muchas frutas y vegetales; el contenido de vitamina C de muchos cultivos puede aumentar cuando la irrigación es menos frecuente).

4. Madurez y métodos de cosecha (las lesiones mecánicas como daños, abrasiones superficiales y cortes pueden producir una pérdida acelerada de la vitamina C).
5. Procedimientos de manipulación post-cosecha: El manejo de la temperatura luego de la cosecha es el factor más importante para mantener la vitamina C de sus frutas y vegetales; las pérdidas se aceleran a altas temperaturas y cuando el almacenaje se prolonga más. Sin embargo, algunas cosechas sensibles a la refrigeración han mostrado más pérdidas de vitamina C a temperaturas más bajas. Las condiciones favorables para la pérdida de agua luego de la cosecha producen una pérdida rápida de la vitamina C. La destrucción del ácido ascórbico puede ocurrir antes de que haya cualquier síntoma visible de la refrigeración. La retención de vitamina C se reduce cuando ocurren daños u otros daños mecánicos y con el corte excesivo. La pérdida de vitamina C luego de la cosecha puede reducirse almacenando las frutas y vegetales en atmósferas con O₂ reducido y/o atmósferas con 10% CO₂; los mayores niveles de CO₂ pueden acelerar la pérdida de vitamina C.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Pardio Sedas et al. (1994) y Lee and Kader (2000), es posible que las frutas del Evento EF2-114 hayan sido sometidas a mayores o menores temperaturas durante el envío al laboratorio ABCR y esto puede haber producido diferencias en las concentraciones de vitamina C entre las piñas MD2 y las piñas del Evento EF2-114.

Otros nutrientes: Los niveles para todos los nutrientes adicionales analizados para las piñas del Evento EF2-114 y las piñas MD2 estuvieron dentro de los rangos normalmente observados en MD2 producidas comercialmente. Por ejemplo, aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$) para la ceniza, los carbohidratos, la humedad, la sacarosa y la leucina (Tabla VII-3), las diferencias fueron pequeñas y los valores promedio estuvieron dentro de los rangos de valores reportados para MD2. Adicionalmente, se han reportado variaciones importantes en la variedad de fruta de piña Mbezi con respecto a la ceniza, el contenido de humedad, la acidez titulable (TA), la grasa, la fibra, las azúcares y el total de sólidos solubles (TSS) (Othman, 2011). Joomwong and Sornsrivichai (2005) reportaron variaciones grandes durante el año para la mayor parte de los rasgos medidos incluyendo TA, TSS, razón TSS/TA, la textura y el pH para la fruta de la piña SC. Wardy et al. (2009) reportó variaciones grandes de vitamina C y azúcares y menores variaciones de acidez, TSS e índices sensoriales para piñas MD2 (diferentes etapas luego de la cosecha), SC y Sugarloaf. Othman et al. (2006) encontraron variaciones grandes para TSS, TA, fructosa, glucosa, sacarosa, total de azúcar, etc. para frutas de la variedad de piña Gandul con o sin tratamiento con Fruitone. Cock and Leal (2012) y Cock et al., (2010) descubrieron que la edad en el momento del forzado produjo variaciones grandes de vitamina C, pH, razón Brix/Ácido con diferentes cultivadores, excepto por SC para la vitamina C.

La Tabla VII-4 presenta un resumen de nuestros resultados en comparación con los datos publicados por la USDA (2013a and 2013b), FAO (2012) y Health Canada (2008) para las

composiciones de nutrientes de la piña. Adicionalmente, ver el Anexo E – Materiales y Métodos para el Análisis de la Composición de las piñas del Evento EF2-114, Anexo F – Calidad Interna del Evento EF2-114, Anexo G – Características de Plantas y Frutas del Evento EF2-114 y Anexo H – Análisis Sensorial del Evento EF2-114 para la comparación de diferentes características de las piñas del Evento EF2-114 y las piñas MD2.

III.C. CONCLUSIONES DEL ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN

Tomando en cuenta todos los análisis, concluimos que el Evento EF2-114 es similar a su variedad parental MD2 con respecto a la composición de nutrientes, excepto por licopeno, β -caroteno y potasio. Otras diferencias en la composición de nutrientes entre las dos variedades están dentro del rango de variaciones naturales de las piñas MD2 e insignificante en el contexto de la dieta Estadounidense.

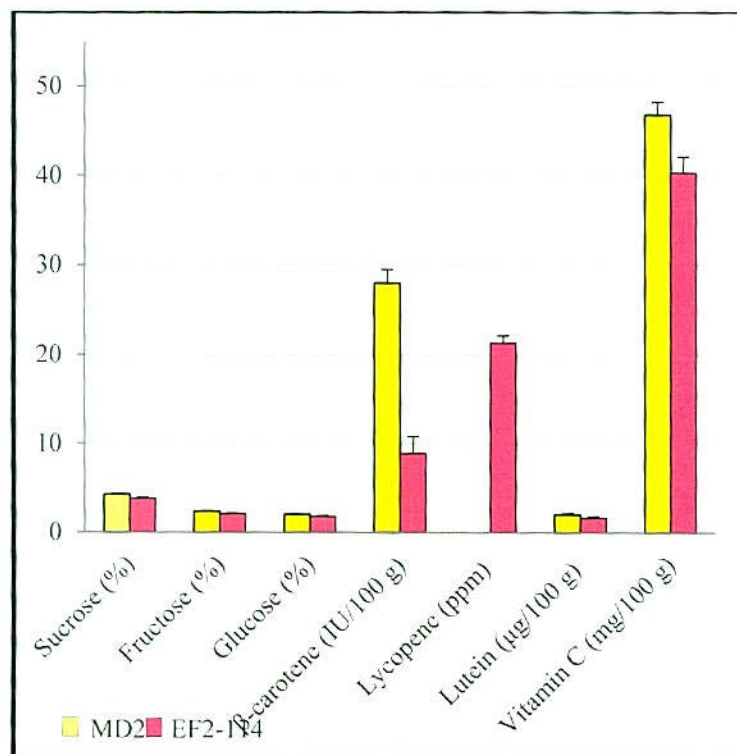
Tabla III-2. Niveles de carotenoides, vitamina C, y potasio en piñas MD2 y las piñas del Evento EF2-114

Composición de nutrientes	MD2				Evento EF2-114				Valor-P
	N	Prom.	Rango	SE	N	Prom.	Rango	SE	
Licopeno (ppm)	18	0.0	0.0 – 0.0	0.0	18	21.3	14.3 – 32.9	0.9	<0.000
β -caroteno (IU/100 g)	18	28.1	20.8 – 39.5	1.5	18	8.9	5.0* - 32.8	1.9	<0.000
Vitamina C (mg/100 g)	18	46.8	36.0 - 55.8	1.4	18	40.3	28.3 - 56.2	1.8	0.008
Potasio (mg/100 g)	18	129	117 - 142	1.7	18	156	101 - 204	6.6	0.0003

* Los límites de detección (LOD) para el β - y el α -caroteno fueron de 10 IU/100 g, por ende, los valores de β -caroteno para las muestras que estaban por debajo del LOD se consideraron como 5 IU/100 g (promedio de 0 y 10). El α - caroteno también se midió en las frutas y los valores estuvieron por debajo del LOD para todas las muestras probadas.

N = Número de frutas analizadas. SE = Error Estándar. La prueba Student *t* se realizó para comparar los analitos. Los resultados que fueron significativamente diferentes en $p < 0.001$ se presentan en negrita.

Figura III-1. Niveles de Carotenoides, vitamina C y azúcar en piñas MD2 y piñas del Evento EF2-114



Los errores estándar han sido representados por las barras.

Tabla III-3. Niveles de componentes, azúcares y aminoácidos en piñas MD2 y Evento EF2-114

Analito	MD2				Evento EF2-114				Valor-P
	N	Prom.	Rango	SE	N	Prom.	Rango	SE	
Componentes									
Fibra total (%)	18	2.8	1.9 - 3.3	0.11	18	2.9	1.7 - 3.8	0.15	0.509
Ceniza (%)	18	0.27	0.23 - 0.32	0.01	18	0.31	0.20 - 0.42	0.01	0.001
Carbohidratos (%)	18	12.0	10.1 - 13.4	0.18	18	11.2	10.0 - 12.7	0.18	0.002
Grasa (%)	18	0.22	0.14 - 0.31	0.01	18	0.17	0.10 - 0.25	0.01	0.016
Humedad (%)	18	86.9	85.5 - 88.8	0.18	18	87.8	86.5 - 89.0	0.18	0.002
Proteína (%)	18	0.58	0.37 - 0.73	0.02	18	0.54	0.35 - 0.78	0.03	0.370
Azúcares									
Sacarosa (%)	18	4.26	3.54 - 5.08	0.11	18	3.81	3.09 - 4.50	0.09	0.004
Fructosa (%)	18	2.34	1.59 - 3.12	0.09	18	2.07	1.51 - 2.68	0.07	0.026
Glucosa (%)	18	2.00	1.33 - 2.74	0.08	18	1.80	1.26 - 2.47	0.06	0.063
Aminoácidos									
Leucina (%)	18	0.034	0.020 - 0.051	0.002	18	0.026	0.017 - 0.040	0.002	0.004
Isoleucina (%)	18	0.025	0.010 - 0.040	0.002	18	0.029	0.012 - 0.041	0.002	0.240
Metionina (%)	18	0.016	0.004 - 0.044	0.003	18	0.008	0.004 - 0.012	0.001	0.011
Valina (%)	18	0.031	0.023 - 0.049	0.002	18	0.033	0.018 - 0.049	0.002	0.399

N = Número de frutas analizadas. SE = Error estándar. Los niveles de nutrientes se presentan en % FW. La prueba Student *t* se realizó para comparar los analitos. Los resultados que fueron significativamente diferentes de $P < 0.01$ se presentan en negrita.

Figura III-2. Color de la pulpa en las frutas MD2 y del Evento EF2-114

Las frutas del Evento EF2-114 (derecha) exhiben un color rosado/rojo en la pulpa debido a la acumulación de licopeno mientras que la variedad parental MD2 (izquierda) tiene pulpa de color dorado.

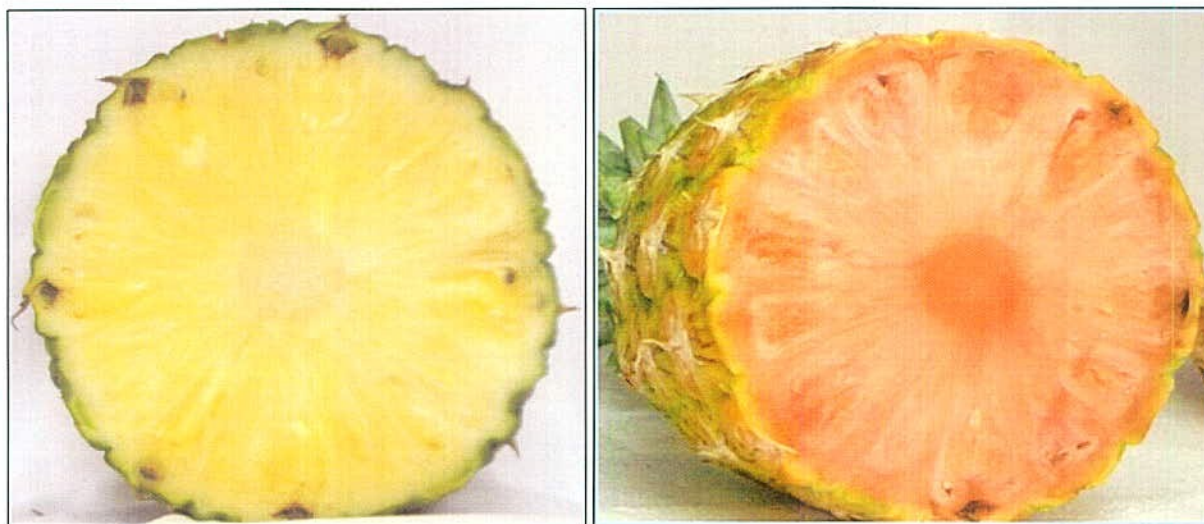


Tabla III-4. Composición de nutrientes de las piñas del Evento EF2-114 y las piñas MD2 en comparación con los datos publicados

Composición de nutrientes	Datos experimentales ¹		Datos publicados en la literatura			
	Evento EF2-114	MD2 (Control)	MD2 (USDA, 2013a)	SC (USDA, 2013b)	SC (FAO, 2012)	Pineapple, cubes (HC, 2008)
Fibra total (%)	2.9	2.8	1.4	NR ²	1.3	1.3
Ceniza (%)	0.31	0.27	0.2	0.27	0.3	NR ²
Carbohidratos (%)	11.2	12	13.5	11.8	12	NR ²
Grasa (%)	0.17	0.22	0.11	0.13	0.2	Te ⁴
Humedad (%)	88	87	86	87	86	NR ²
Proteína (%)	0.54	0.58	0.53	0.55	0.4	Te ⁴
Sacarosa (%)	3.81	4.26	6.47	4.59	NR ²	NR ²
Fructosa (%)	2.07	2.34	2.15	1.94	NR ²	NR ²
Glucosa (%)	1.8	2	1.7	1.76	NR ²	NR ²
β -caroteno (IU/100 g)	9	28	34	31	61 equivalentes de β -caroteno ³ (30.5 β -caroteno)	34
Licopeno (ppm)	21	0	0	0	NR ²	0
Luteína (mcg/100 g)	1.7	2.3	0	0	NR ²	NR ²
Vitamina C (mg/100 g)	40.3	46.8	56.4	16.9	30	56
Leucina (%)	0.026	0.034	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²
Isoleucina (%)	0.029	0.025	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²
Metionina (%)	0.008	0.016	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²
Valina (%)	0.033	0.031	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²
Potasio (mg/100 g)	156	129	108	125	205	107

¹ Valores promedio

² NR = No reportado

³ Estimación: 1 mg de equivalentes de β -caroteno = 1 parte de β -caroteno + 0.5 partes de α -caroteno + 0.5 partes de β -criptoxantina

⁴ Te = Traza

HC, 2008 = Health Canada, 2008

Tabla III-5 Consumo de fruta fresca en Estados Unidos (kg per cápita, 2006-2011)

Frutas	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Mean
Banano	11.4	11.8	11.4	11.6	11.7	11.6	11.6
Manzana	7.8	7.2	7.1	6.9	7.0	7.0	7.2
Naranjas, toronjas y mandarinas	5.7	4.4	5.7	5.6	5.7	5.6	5.5
Uvas	3.8	4.0	4.1	4.2	4.1	4.0	4.0
Fresa	2.6	2.7	2.7	2.8	2.8	2.7	2.7
Piña	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Cerezas	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Fuente: Agri-Food Trade Service, 2012

Tabla III-6. Suministro de potasio (K) de fuentes de consumo de fruta en Estados Unidos

Frutas	Consumo diario ^a (g)	Contenido K ^Δ (mg/100g)	Ingesta diaria promedio per cápita (mg)	Suministro de K de acuerdo con el valor diario [■]
Banano	31.7	358	113.6	2.4%
Manzanas	19.6	107	21.0	0.4%
Naranjas, toronjas y mandarinas	14.9	173	25.8	0.5%
Uvas	11.1	203	22.4	0.5%
Fresa	7.4	153	11.4	0.2%
Piña	6.0	109	6.6	0.1%
Cerezas	1.2	222	2.6	0.1%

Fuentes: (*) Estimado a partir de los datos que se presentan en la Tabla VII-5

(Δ) USDA (2013g)

(■) Calculado utilizando 4,700 mg por día como el consumo adecuado de potasio para adultos (USDA y Departamento de Salud y Servicios Humanos de EUA, 2010).

III.D. REFERENCIAS

- Agri-Food Trade Service. 2012. American eating trends report. International Markets Bureau - Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada.
- Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S and Sungpuag P. 2009. Beta-caroteno, licopeno, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. Food Chem. 113:202-207.
- Cock WRS, Leal NR, Tardin FD, Avelar JC, Júnior SPF, Souza LM and Ferreira KS. 2010. Development and quality of pineapple genotypes under different flowering induction periods in Campos dos Goytacazes, RJ. Acta Hort. 864: 219-225.

- Cock WRS and Leal NR. 2012. Productive performance and Vitamin C content in *Ananas comosus* L. Merrill submitted to different periods of flower induction. *Acta Hort.* 928: 205-211.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M and Robledo CW. 2011. InfoStat software, version 2011, Grupo InfoStat, FCA, National University of Cordoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- FAO, 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. West African food composition table. In: International Network of Food Data Systems (INFOODS). <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/> (accessed August 30, 2013).
- Gaillhofer G, Wilders-Truschnig M, Smolle J and Ludvan M. 1998. Asthma caused by bromelain: an occupational allergy. *Clinical Allergy* 18:445-450.
- Ganeshamurthy AN, Satisha GC and Prakash P. 2011. Potassium nutrition on yield and quality of fruit crops with special emphasis on banana and grapes. *Karnataka J. Agric. Sci.* 24 (1) : (29-38).
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P and Taylor MA. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.* 26:139-145.
- Hale LP, Greer PK, Trinh CT and Gottfried MR. 2005. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10 deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunol.* 116:135-142.
- Health Canada, 2008. Nutrient Value of some common foods. Publications of Health Canada. Ottawa, Canada. Retrieved from http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/nutrition/fiche-nutri-data/nvscf-vnqau-eng.pdf
- Helms S and Miller A. 2006. Natural treatment of chronic rhinosinusitis. *Altern. Med. Rev.* Sept 11(3):196-207.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(3):210-218
- Joomwong A and Sornsrivichai J. 2005. Morphological characteristic, chemical composition and sensory quality of pineapple fruit in different seasons. *Chiang Mai University J. Nat. Sci.* 4(2):149-164.
- Lee K and Kader AA. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Tec.* 20:207-220.

- Levine M. 2000. Vitamin C. In: Song, Beecher, & Eitenmiller. Modern analytical methodologies in fat- and water-soluble vitamins. Volume 154. New York: John Wiley & Sons. pp. 411-445.
- Lotz-Winter H. 1990. On the pharmacology of bromelain: An update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Plant Medica* 56:249-253.
- Ma C, Ma B, He J, Hao Q, Lu X and Wang L. 2011. Regulation of carotenoid content in tomato by silencing of licopeno β/ϵ -ciclase genes. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 29:117-224.
- Mateljan G. 2007. *The World's Healthiest Foods*. Seattle, Washington. 879 p.
- Maurer HR. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use [review]. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1234-1245.
- Morton JF. 1987. Pineapple. In: *Fruits of Warm Climates*. Miami, Florida. pp. 18-28.
- Murwan SabahelKhier K, Saifeldin Hussain A and Ishag KEA. 2010. Effect of maturity stage on protein fractionation, in vitro protein digestibility and anti-nutrition factors in pineapple (*Ananas comosus*) fruit grown in southern Sudan. *Afr. J. Food Sci.* 4:550-552.
- Mynott TL, Ladhams A, Scarmato P and Engwerda CR. 1999. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T-cells. *J. Immunol.* 163:2568-2575.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 1990a. 15th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 922.06.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 1990b. 15th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 948.15.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 1994. 17th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 941.15.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000a. 17th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 991.43.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000b. 17th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 942.05.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000c. 17th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 920.153.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000d. 17th Ed., AOAC International, Arlington, VA, USA, Official Method 920.151.

- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000e. 17th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 977.20.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2000f. 17th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 984.22.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2001. 17th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 2001.13.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005a. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 981.10.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005b. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 988.15.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005c. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 994.12.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005d. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 982.30.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005e. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 984.27.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005f. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 941.15.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 2006. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 967.21.
- Othman O. 2011. Physicochemical characteristics and levels of inorganic elements in off-vine ripened pineapple (*Ananas comosus* L.) fruits of Dar es Salaam, Tanzania. KIST J. Sci. Tech. 1:23-30.
- Othman Z, Madom MS, Osman A and Mohamed S. 2006. The post harvest sensory and chemical characteristics of cold-stored pineapples pretreated with different Fruitone concentrations. J. Sci. Food Agric. 86:2067-2075.
- Pardio Sedas VT, Waliszewski Kubiak KN and Garcia Alvarado MA. 1994. Ascorbic acid loss and sensory changes in intermediate moisture pineapple during storage at 30–40°C. Int. J. Food Sci. Tech. 29:551-557.
- Purseglove JW. 1972. Tropical Crops. Monocotyledons. Longman, London. pp. 75-91.

- Quaggio JA, Teixeiraa LAJ, Cantarella H, Mellis EV and Sigrist JM. 2009. Post-harvest behaviour of pineapple affected by sources and rates of potassium. *Acta Hort.* 822:277-284.
- Ramsaroop RES, Saulo AA. 2007. Comparative consumer and physicochemical analysis of Del Monte Hawaii Gold and Smooth Cayenne pineapple cultivars. *J Food Qual* 30:135–159
- Shamsudin R, WanDaud WR, Takriff MS, Hassan O. 2007. Physicochemical properties of the Josapine variety of pineapple fruit. *Int J Food Eng* 3(5):9
- Secor Jr., ER, Carson WR, Cloutier M, Guernsey LA, Schramm CM, Wu CA and Thrall RS. 2005. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cell. Immunol.* 237:68-75.
- Serio F, Leo L, Parente A, and Santamaria P. 2007. Potassium nutrition increases the lycopene content of tomato fruit. *J of Hort Science & Biotech* **82**: 941–945
- Taber H, Perkins-Veazie P, Li S, White W, Rodermeil S and Xu Y. 2008. Enhancement of tomato fruit Lycopene by potassium is cultivar dependent. *HORTSCIENCE* 43:159-165.
- Tochi BN, Wang Z, Xu S-Y and Zhang W. 2008. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): A review. *Pakistan J. Nutr.* 7(4):513-520.
- USDA ARS. 2009. National nutrient database for standard reference. <http://ndb.nal.usda.gov/>.
- USDA and U.S. Department of Health and Human Services. 2010. Dietary guidelines for Americans, 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- USDA ARS. 2013a. National nutrient database for standard reference, Release 25. NDB No. 9430. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2442?fg=&man=&lfacet=&count=&max=25&sort=&qlookup=pineappl+extra+sweet&offset=&format=Full&new=> (accessed July 10, 2013).
- USDA ARS. 2013b. National nutrient database for standard reference, Release 25. Software v.1.2.2. NDB No. 9429. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2441?fg=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=> (accessed July 10, 2013).
- USDA. 2013c. National nutrient database for standard reference, Release 25. Lycopene (µg) content of selected foods per common measure. NDB No. 11529, 9326, 9112. <https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/nutrlist/sr25w337.pdf> (accessed July 10, 2013).

- USDA. 2013d. National nutrient database for standard reference, Release 25. Caroteno, beta (µg) content of selected foods per common measure. <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/nutrlist/sr25w321.pdf> (accessed July 12, 2013).
- USDA. 2013e. National nutrient database for standard reference, Release 25. Lutein + zeaxanthin (µg) content of selected foods per common measure. <https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/nutrlist/sr25w338.pdf> (accessed July 12, 2013).
- USDA. 2013f. National nutrient database for standard reference, Release 25. Caroteno, α (µg) content of selected foods per common measure. <https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/nutrlist/sr25w322.pdf> (accessed July 10, 2013).
- USDA. 2013g. National nutrient database for standard reference, Release 25 and 26. Potassium, K (mg) content of selected foods per common measure. <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/nutrlist/sr25w306.pdf> (accessed July 10, 2013).
- Van Dyk TK, Ayres BL, Morgan RW and Larossa RA. 1998. Constricted Flux through the Branched-Chain Amino Acid Biosynthetic Enzyme Acetolactate Synthase Triggers Elevated Expression of Genes Regulated by *rpoS* and Internal Acidification. J. Bacteriol. 180:785-792.
- Wardy W, Saalia FK, Steiner-Asiedu M, Budu AS and Sefa-Dedeh S. 2009. A comparison of some physical, chemical and sensory attributes of three pineapple (*Ananas comosus*) varieties grown in Ghana. Afr. J. Food Sci. 3:022-025.
- West CE, Pepping F and Temalilwa CR. 1988. The composition of foods commonly eaten in East Africa. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands. 84 p.

IV.