

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
SOLICITUD
REGISTRO DE PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No _____

TITULO PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA
PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE"

CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

SOLICITANTE DEL MONTE FRESH PRODUCE

DOMICILIO FLORIDA, ESTADOS UNIDOS DE
AMÉRICA

APODERADO DARIO CARDENAS NAVAS

BOGOTA D.C. _____

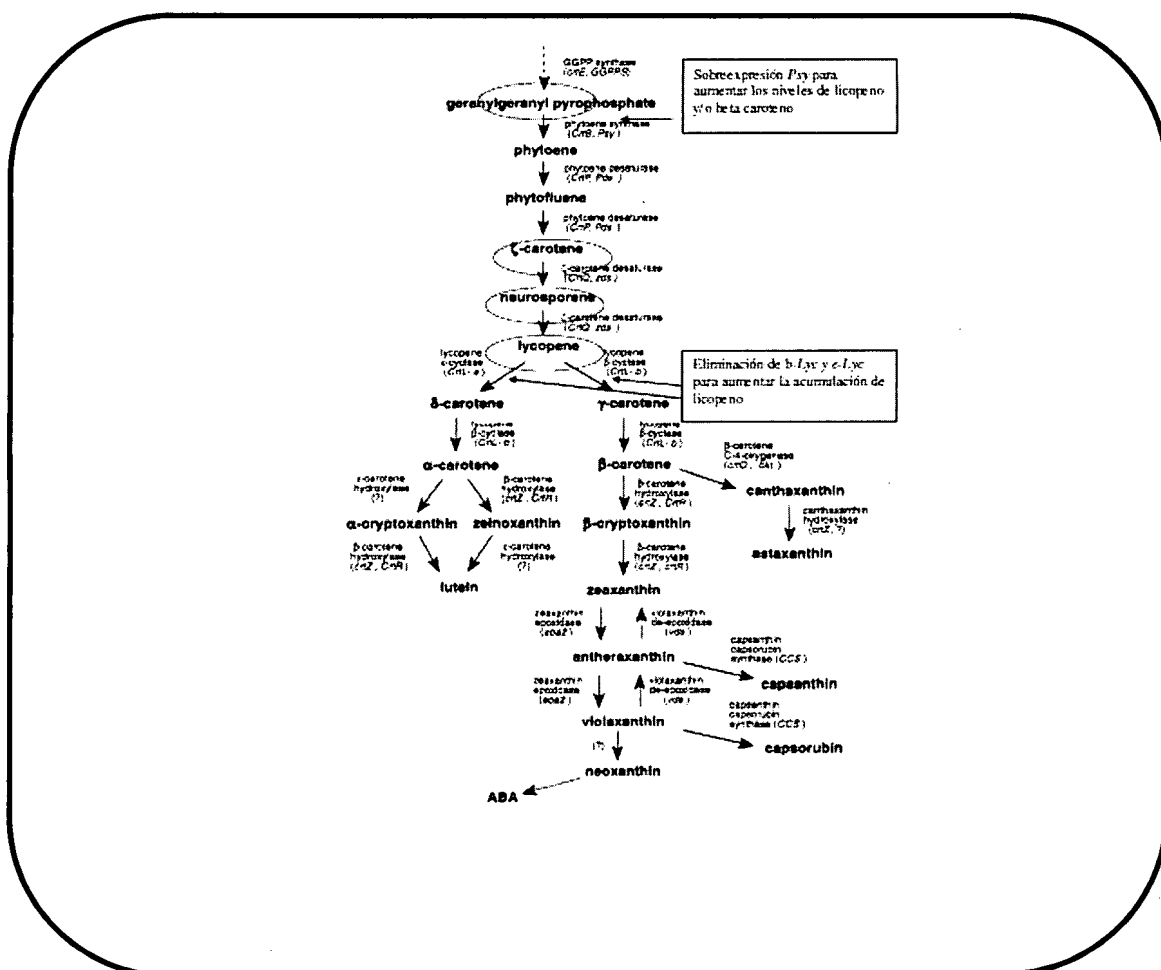
PETITORIO									
				SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-116147- -00000-0000 Fecha: 2013-05-09 13:48:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO Act. 411 PRESENTACION Folios: 46					
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE									
SOLICITUD DE:									
☒ Patente de Invención				☐ Patente de Modelo de Utilidad					
SOLICITANTE		Nombre: DEL MONTE FRESH PRODUCE Dirección: 241 Sevilla Ave, Coral Gables, FL 33134 Nacionalidad o Domicilio: Florida, Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: 313 7800 Fax: 312 2410 E-mail: infopi@cardenasycardenas.com				IDENTIFICACION ☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☒ Otro Cuál Número			
REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: ANA MARIA RUIZ RUEDA Dirección: Carrera 7 No 71-52 Torre B Piso 9 Teléfono: 313 7800 Fax: 312 2410 Email: infopi@cardenasycardenas.com				IDENTIFICACIÓN ☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cuál Número 39790288 Bta TP 84.909			
		En caso de hacer presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder) _____							
INVENTOR (ES) (72)		Nombre: (Ver anexo) Dirección: Nacionalidad o Domicilio:							
Título (54) :									
PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE"									
Número de Reivindicaciones:				DOS (2)					
Clasificación Internacional (51)									
8		(33) País de Origen		(32) Fecha		(31) Número de Solicitud			
Prioridad		US		04.06.2012		13/507,101			
☒ SI ☐ NO									
9 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud o de la prioridad invocada a los:									
☒ Inmediato		☐ 6 meses		☐ 12 meses		☐ 18 meses			
10 Comprobante de Pago No: 13-0043235 Fecha: 08.05.2013									

1

☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
☐	Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
☒	Comprobante de pago por reivindicación de prioridad (13-0043236)
☐	Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
☐	Poder, si fuere el caso
☐	Certificado de la fecha de presentación de la solicitud prioridad expedida por la autoridad correspondiente y una copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
☐	Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
☒	Resumen
☒	Descripción de la invención
☒	Una o más reivindicaciones
☒	Dibujos y/o planos necesarios
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
☒	Arte final 12 x 12 cm
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por
☐	El mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

12

FIGURA CARACTERÍSTICA



13 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ANA MARIA RUIZ RUEDA

FIRMA:

Ana Maria Ruiz Rueda

C.C. 39790288 BTA

TP 84909 CSJ NPV

2

④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Ebrahim Firoozabady
	Dirección: 241 Sevilla Ave. Coral Gables, FL 33134
	Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Thomas Young
	Dirección: 241 Sevilla Ave. Coral Glables, FL 33134
	Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0043235
		Bogotá D.C., Mayo 08 de 2013 - 08:52:01

RECIBIDO DE : CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PI LTDA					NI 830.083.491
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	562579065	08/05/2013	12.125.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
		=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-116147- -00000-0000
Fecha: 2013-05-09 13:48:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 46

13 MAY 2013 13:48

13 MAY 2013 13:48

4

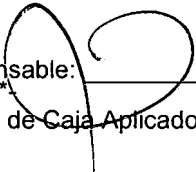
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0043236
		Bogotá D.C., Mayo 08 de 2013 - 08:52:01

RECIBIDO DE : CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PI LTDA					NI 830.083.491	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	562579065	08/05/2013	12.125.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES	175.000.00	175.000.00
				\$175.000.00
=====				

SON: **CIENTO SETENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

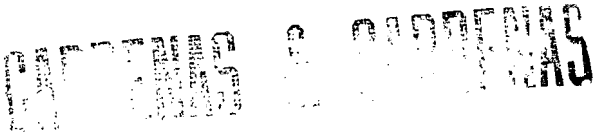
Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-116147- -00000-0000
Fecha: 2013-05-09 13:48:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 46





5

☒

Patente de Invención

☐

Patente modelo de utilidad

☐

PCT

(21) No De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) DEL MONTE FRESH PRODUCE
(30) Prioridad	(72) Inventor (es) Ebrahim Firoozabady Thomas Young
(31) No Prioridad 13/507,101	
(32) Fecha 04.06.2012	
(33) País US	(74) Apoderado (s) DARIO CARDENAS NAVAS

(54) Título **PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE"**

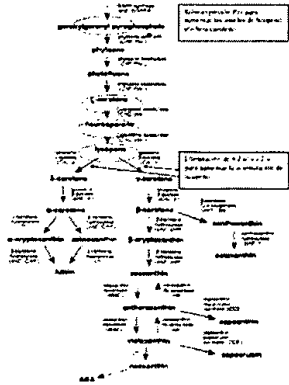
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite de inicio Fase Nacional 04.06.2013	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud No de Solicitud PCT	(87) Publicación internacional Fecha No Publicación

Resumen reivindicación (es):
Se proporciona un proceso que tiene como resultado el desarrollo de una nueva variedad de piña llamada 'Rosé'. El color interno rojo o rosa junto con la morfología única de la cáscara y la posibilidad del rasgo de control de floración son rasgos de esta nueva variedad.

	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO									
	DIVISION DE NUEVAS CREACIONES									
	TARJETA DE ARCHIVO PROPIETARIOS									
	PATENTE DE INVENCION		X	PCT		MODELO DE UTILIDAD			DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) No de solicitud:					(22) Fecha de solicitud:					
(51) Clasificación Internacional:										
(71)Solicitante(s) DEL MONTE FRESH PRODUCE										
(72) Inventor(es) Ebrahim Firoozabady; Thomas Young										
(74) Apoderado: DARIO CARDENAS NAVAS										
(30) Prioridad		(31) No Prioridad		(32) Fecha		(33) País				
		13/507,101		04.06.2012		US				
(85) Fecha inicio fase nacional: 04.06.2013										
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT										
Fecha de presentación de la solicitud:										
No de solicitud:										
(54) Título PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE" 7										

	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO									
	DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES									
	TARJETA DE ARCHIVO TEMÁTICO									
	PATENTE DE INVENCION			PCT	X	MODELO DE UTILIDAD			DISEÑO INDUSTRIAL	

(21) No de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:		
(71) Solicitante(s) DEL MONTE FRESH PRODUCE				
(72) Inventor (es)				
(74) Apoderado: DARIO CARDENAS NAVAS				
(30) Prioridad	(31) No Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	13/507,101	04.06.2012	US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 04.06.2013		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc.		Fecha:		
Fecha de presentación de la solicitud:		No Publicación:		
No de Solicitud				
(54) Título: PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE PIÑA LLAMADA "ROSE"				

(57) Resumen:

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

Título de la Patente:
Proceso para el desarrollo de la Planta de piña llamada 'Rosé' (EF2-114)

DESCRIPCIÓN

Proceso para el desarrollo de la especie: *Ananas comosus*, denominación de la variedad 'Rosé', con el nombre del fitomejorador EF2-114.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la ingeniería agrícola.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

En cuanto a características y calidad interna de la fruta, la planta es muy similar a la planta madre de MD2. Sin embargo, el color de la pulpa interior de la Rosé es de color rosa o rojo, debido a la acumulación de licopeno en la parte comestible de la fruta. La morfología de la cáscara se conoce como "Tigre" y puede ser que sea tolerante a la ocurrencia natural de la

floración. Esta nueva variedad se ajusta mejor al mercado de fruta fresca y la fruta residual se puede procesar como jugo o como producto congelado.

El objetivo principal de la presente invención era generar un proceso innovador que diera como resultado la producción de una variedad de piña única y diferenciada mediante la acumulación de altos niveles de carotenoides: mientras que la misma conservara la mayoría de las características de la línea materna, MD2.

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

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

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

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

del gen inhibidor de la bromelina, que impulsa la sobreexpresión en la fruta del constructo de ARNi (Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005).

La inducción floral puede ocurrir naturalmente, principalmente en presencia de temperaturas bajas y días cortos. La floración natural de las plantas de piña es un problema importante en la industria. Para obtener la característica del control de floración hemos alterado la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de etileno. El etileno es un regulador de crecimiento que juega un papel importante en todas las fases de desarrollo de la planta, incluyendo la germinación de semillas, la maduración de fruto, la senescencia de hojas y flores y la abscisión. En las plantas, el etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina (Ver Figura 2). El precursor inmediato del etileno en plantas vasculares es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Adams and Yang, 1979).

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

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

Método de Transformación

La piña fue transformada, siguiendo un método descrito por Firoozabady (Patente de EE.UU. N° 8, 049,067) mediante una transformación de los tejidos organogénicos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas de *Agrobacterium* fueron co-cultivadas con tejidos receptores de piña, para lograr tantos fenotipos con alto contenido de carotenoides como de floración controlada, estas cepas contenían un plásmido de transformación, ya sea para aumentar la biosíntesis de carotenoides o para disminuir la biosíntesis de etileno. Se seleccionaron presuntos tejidos transformados en medio que contenía closulfuron y posteriormente fueron revisados para detectar la presencia de genes mediante PCR.

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

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

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

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

El plásmido pHCW1 usado para las transformaciones de piña, fue construido por el Laboratorio de Del Monte Fresh Produce Company en Richmond, California, EUA. pHCW1 contiene un gen resistente a la tetraciclina (tetRA) proveniente del plásmido RP1 y el origen de replicación del plásmido pACYC, que permite la sección y mantenimiento en *Escherichia coli* y el replicón pVS1 derivado del *Pseudomonas aeruginosa*, que asegura la replicación en *Agrobacterium tumefaciens*. pHCW1 contiene la secuencia de 25 pares de bases que delimita la transferencia de ADN -T a la secuencia de 100 bases sintéticas entre los límites que forman múltiples sitios de restricción de clonación para permitir la integración de diferentes casetes de ADN -T (Ver Cuadro 1).

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

La ingeniería genética del MD2 se llevó a cabo en el Laboratorio de Del Monte Fresh Produce Company en Richmond, California, USA, donde se produjeron plantas transgénicas y se propagaron en cultivo de tejidos. Los propágulos fueron luego llevados al área de investigación

MS

de la Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte, S.A. (Pindeco), Buenos Aires, Puntarenas, Costa Rica para su evaluación de campo, para la propagación en el campo y para la propagación en masa de esta variedad en el laboratorio.

SOBRE EL PROCESO

Se ha desarrollado un nuevo proceso para generar una nueva variedad de piña (*Ananas comosus*), de la familia Bromeliaceae, utilizando técnicas de ingeniería genética, llamada 'Rosé' o EF2-114. Se utilizó como material de partida coronas de la variedad MD2 (también conocida como piña Del Monte Gold) para producir brotes en cultivo in vitro, introducir genes y elementos de ADN en secciones basales foliares, regenerar plantas completas, realizar pruebas de campo y seleccionar plantas con frutas de color interno rosa o rojo. Las plantas seleccionadas se propagaron asexualmente en el campo y a través de cultivo de meristemos para confirmar los rasgos de colores y otras características relacionadas a las frutas y al rendimiento agronómico. El invento tiene que ver con la producción de una variedad nueva y diferente de la familia de la piña, Bromeliaceae.

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

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

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA

La descripción de la nueva variedad se basa en la observación de ejemplares que recibieron buena nutrición y que fueron cultivados bajo condiciones de campo, en la región de Buenos Aires de Costa Rica, donde la temperatura generalmente oscila entre 14° C y 37° C y la precipitación promedio anual es de 3251 mm.

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

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

IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA:

- Nombre: *Ananas comosus*.
- Parentesco: MD2.
- Origen: Ingeniería genética de MD2 seguido por la selección de los rasgos de interés en las pruebas de campo.
- Botánica: Bromeliaceae o familia de la piña. Subfamilia: Bromelioideae. Género: *Ananas*. Subgénero: *comosus*. Variedad: “Rosé”, nombre del mejorador EF2-114.
- Comercial: *Bromelia frutal*.

General:

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

Cuadro 1.Elementos Genéticos del plásmido pHCW1

Elemento Genético	Origen y función
RB	Una secuencia de nucleótido de 25 pares de bases que actúa como el punto inicial de la transferencia de ADN a las células vegetales, el cual fue aislado originalmente a partir de pTiT37 (Depicker et al., 1982).
pVS1	El replicón pVS1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , que asegura la replicación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al., 1984).
TetRA	Un gen resistente a la tetraciclina del plásmido RP1, que permite la selección del plásmido binario en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Escherichia coli</i> (Waters et al., 1983).
pACYC	El origen de la replicación del plásmido pACYC, que asegura la replicación en <i>Escherichia coli</i> (Chang et al., 1979).
LB	Una secuencia de 25 nucleótidos que delimita la transferencia ADN-T y actúa como el punto final de la transferencia de ADN en células vegetales.

	Se aisló originalmente del TiA6 (Barker et al., 1983).
MCS	Una secuencia de 110 nucleótidos creada sintéticamente, que se compone de sitios de restricción de clonaje múltiples que permiten la integración de diferentes casetes dentro del plásmido.

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

Elemento Genético	Tamaño (Kb)	Función (Referencia)
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado del gen inhibidor de la bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que dirige la sobre expresión del (los) gen(es) blanco específicamente en la fruta.
Psy	1.131	Un gen de la fitoeno sintansa (Psy) de <i>Citrus reticulata</i> , idéntico al gen aislado de la mandarina (Ikoma et al. 2001), el cual codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de los carotenoides.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia de poliadenilación del gen ubiquitina (Ubi) de <i>Ananas comosus</i> , finaliza la transcripción del (de los) transgen (es).
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado de la secuencia promotora del gen inhibidor de bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que dirige la sobre expresión del transgen ARNi específicamente en la fruta.
eLyc fragmento con sentido	0.504	Un fragmento del gen licopeno ϵ -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en orientación sentido, que se usa en un sistema de expresión de ARNi para regular secuencia abajo a la licopeno ϵ -ciclase endógena, una enzima que participa en la biosíntesis de carotenoides.
ST-LS1	0.193	Un intrón del gen ST-LS1 específico para el tejido fotoinducible de <i>Solanum tuberosum</i> que funciona como un espaciador entre los fragmentos de gen sentido y antisentido para aumentar la estabilidad del vector.
eLyc fragmento antisentido	0.504	Un fragmento del gen de la enzima licopeno ϵ -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en orientación antisentido, que se usa en un sistema de expresión del ARNi para regular secuencia abajo la licopeno ϵ -ciclase endógena, una enzima empleada en la biosíntesis carotenoides.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia poliadenilada del gen ubiquitina (Ubi) de <i>Ananas comosus</i> que finaliza la

		transcripción del transgen ARNi.
BRIp2.5	2.5	Un promotor derivado de la secuencia de promotores de un gen inhibidor de bromelina (BRI) de <i>Ananas comosus</i> que dirige la sobre expresión del transgen ARNi específicamente en la fruta.
b-Lyc fragmento con sentido	0.619	Un fragmento del gen licopeno β -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en la orientación sentido, que se usa en un sistema de expresión de ARNi para regular secuencia abajo la licopeno β -ciclase endógena, una enzima involucrada en la biosíntesis carotenoides.
ST-LS1	0.193	Un intrón del gen ST-LS1 específico para tejido foto inducible de <i>Solanum tuberosum</i> (Eckes et al, 1986) que funciona como espaciador entre fragmentos de gen sentido y contrasentido incrementando la estabilidad del vector.
b-Lyc fragmento anti-sentido	0.619	Un fragmento del gen licopeno β -ciclase de <i>Ananas comosus</i> en orientación contrasentido, que se usa en un sistema de expresión del ARNi para regular secuencia abajo la licopeno β -ciclase endógeno, una enzima que es parte de la biosíntesis carotenoides.
Ubpter	0.94	Un terminador derivado de la secuencia poliadenilada del gen ubiquitina (Ubip) de <i>Ananas comosus</i> que finaliza la transcripción del transgen ARNi.
Marcador Seleccionable		
EHS1.7- Ubp1.5	4.257	Un promotor derivado del gen epóxido hidrolasa (EHS) fusionado al promotor de gen ubiquitina (Ubip) y al intrón nativo de <i>Ananas comosus</i> que dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable.
EHS1.7	1.7	Un promotor derivado del gen epóxido hidrolasa (EHS) de <i>Ananas comosus</i> (Neuteboom et al, 2002) que dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable.
Ubp1.5	1.5 + 1.057	Un promotor del gen tetrámero de ubiquitina con una longitud de 1.5 kb y que deriva de la piña (<i>Ananas comosus</i>), el mismo dirige la expresión constitutiva del gen marcador seleccionable. El promotor incluye un intrón endógeno con una secuencia de 1057 pb.
ALS	1.17	Un gen muntado de la enzima acetolactato sintasa de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>), que le confiere resistencia al closulfuron y permite la selección de células transformadas (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).
ALS 3'	2.7	Un terminador endógeno derivado de la señal de

		poliadenilación no traducida del gen de la acetolactato sintasa (ALS) de <i>Nicotiana tabacum</i> (Chaleff and Mauvais, 1984; Lee et al., 1988).
--	--	--

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

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

Esquema 1: la producción de piñas EF2-114.

	Etapas	Fecha (duración)
↓	Llegaron frutas inmaduras de MD2 (40 días anteriores a la cosecha), provenientes de Hawái	10/8/2005
	Se aislaron y cultivaron meristemos de las coronas	17/8/2005
	Se estableció el cultivo <i>in vitro</i> y se inicia la propagación	de 17/8/2005 a 20/9/2006
	Se prepararon y cultivaron secciones longitudinales de los brotes	de 20/9/2006 a 29/9/2009
	Se prepararon secciones de la parte baja de la hojas (bases foliares) y se mezclaron con las cepas AG-62 y Ag-76 de <i>Agrobacterium</i> y se co-cultivaron durante tres días	de 29/9/2006 a 02/10/2006
	Se transfirieron las bases foliares a un medio de recuperación con carbenicilina (para eliminar <i>Agrobacterium</i>)	de 02/10/2006 a 27/10/2006
	Se transfirieron las bases foliares a un medio de selección con antibióticos (para asegurar la erradicación de cualquier <i>Agrobacterium</i> residual) y clorsulfurón, CS (un herbicida), para la selección de células vegetales transformadas y para producir materiales organogénicos	27/10/2006, 2/11/2006, 14/11/2006, 4/12/2006, 3/1/2007, 29/1/2007, 15/2/2007

transformados. Se llevaron a cabo un total de 7 transferencias incrementando la presión de selección para producir pequeños yemas 100%transgénicos.	
Se transfirieron pequeños grupos de brotes (dos veces) a un medio con CS y antibióticos para seguir cultivando y transformando los brotes y yemas de los brotes	13/3/2007, 29/3/2007
Se transfirieron brotes y yemas de brotes a un medio con alta concentración de agar (8 y 10 g/l) para normalizar los brotes y yemas de brotes transformados	10/4/2007
Se transfirieron grupos de brotes a un medio con CS, antibióticos, Agar (7-10) y hormonas para normalizar y propagar los brotes.	de 4/5/2007 a 14/12/2007
Un evento conocido como 16.184.1 incluía 14 líneas fueron subcultivadas en un medio líquido para su posterior crecimiento	21/1/2008
Se enviaron 9 líneas o grupos adicionales del evento 16.184.1 (compuesto de 349 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los 9 grupos se enumeraron como 109-117 en Pindeco, se aclimataron en el invernadero y posteriormente se emplearon para las pruebas de campo.	14/2/2008
Se enviaron 2 líneas o grupos adicionales del evento 16.184.1 (compuesto de 85 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los grupos se enumeraron como 208 y 209 en Pindeco se aclimataron en el invernadero y posteriormente se emplearon para las pruebas de campo.	1/8/2008
Los análisis por el método de PCR confirmaron que los genes están presentes en las muestras de brotes del evento producidos a través de de cultivo de tejidos.	26/8/2008
Se enviaron 2 líneas o grupos adicionales del evento 16.184.1 (compuesto de 150 brotes) a Pindeco para pruebas de campo. Los grupos se enumeraron como 345 y 346 en Pindeco, se aclimataron en el invernadero y posteriormente se emplearon para las pruebas de campo.	26/1/2009
Las plantas se cultivaron en el invernadero durante 15-20 semanas antes de ser transferidas al suelo para las pruebas de campo. Los frutos se cortaron para evaluar su coloración interna. Durante las pruebas de campo, los grupos 109, 110, 114, 116, 208, y 346 mostraron una coloración interna rosa o roja. La calidad interna (Brix, ácido cítrico, ácido ascórbico y pH) se evaluó en los frutos con color en pulpa y los propágulos se cultivaron para la evaluación de futuras generaciones. Los análisis moleculares (PCR y Southern) confirmaron la presencia de los genes. El análisis Southern además confirmó que todos los de este grupo son de un mismo evento transgénico, que se conoce colectivamente como EF2-114	2009-2012

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

Nombre propuesto para la variedad MD-2

(+) Ver punto “VI. OBSERVACIONES Y FIGURAS”.

Características	Descripción de la característica	Código para cada descripción MD-2
1. Planta: posición de las hojas (+)	<i>semi-erect</i> <i>intermediaria</i> <i>abierta</i>	<u>7</u>
2. Planta: número de hojas activas (+)	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>
3. Hoja: largo (+)	<i>corto</i> <i>intermedio</i> <i>largo</i>	<u>5</u>
4. Hoja: ancho (+)	<i>delgado</i> <i>intermedio</i> <i>ancho</i>	<u>5</u>
5. Hoja: color que predomina en la cara superior	<i>verde claro</i> <i>verde oscuro</i> <i>morado-verde</i> <i>verde-morado</i> <i>morado</i> <i>rojo</i>	<u>2</u>
6. Hoja: pigmentación antiociánica	<i>ausente</i> <i>presente</i>	<u>1</u>
7. Hoja: variegación	<i>ausente</i> <i>presente</i>	<u>1</u>
8. Hoja: espinas (+)	<i>ausente</i> <i>inconspicuas</i> <i>conspicuas</i>	<u>2</u>
9. Hoja: distribución de las espinas en el margen (+)	<i>sólo en la base</i> <i>sólo en el ápice</i> <i>en la base y el ápice</i> <i>regular</i> <i>irregular</i>	<u>2</u>
10. Inflorescencia: número de flores (+)	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>

11. Flor: color predominante del sépalo	blancuzco verdoso purpurino	<u>3</u>
12. Flor: base de los pétalos	libre fusionada	<u>1</u>
13. Flor: pétalos imbricados	ausente presente	<u>2</u>
14. Flor: color predominante del ápice del pétalo	blancuzco morado claro morado morado oscuro	<u>5</u>
15. Flor: proporción del color blanco en los pétalos (+)	bajo intermedio alto	<u>3</u>
16. Flor: disposición de las anteras	separadas agrupadas	<u>2</u>
17. Flor: cantidad de polen en las anteras	bajo intermedio alto	<u>3</u>
18. Flor: longitud del estilo (+)	corto intermedio largo	<u>2</u>
19. Retoños: cantidad (+)	bajo intermedio alto	<u>5</u>
20. Pedúnculo: longitud (+)	corto intermedio largo	<u>3</u>
21. Pedúnculo: diámetro en la parte central (+)	pequeño mediano grande	<u>5</u>
22. Pedúnculo: cantidad de <u>hijos/s</u> (+)	(ausente o muy bajo) (bajo) (intermedio) (alto) (muy alto)	<u>3</u>
23. Pedúnculo: número de brácteas	bajo intermedio alto	<u>5</u>
24. Pedúnculo: brácteas imbricadas	ausente presente	<u>2</u>
25. Pedúnculo: tricomas	ausente presente	<u>2</u>

26. Fruto: longitud (+)	<i>corto</i> <i>intermedio</i> <i>largo</i>	<u>5</u>
27. Fruto: diámetro en la base (+)	<i>pequeño</i> <i>mediano</i> <i>grande</i>	<u>7</u>
28. Fruto: diámetro en la parte media	<i>pequeño</i> <i>mediano</i> <i>grande</i>	<u>7</u>
29. Fruto: diámetro de la parte alta (+)	<i>pequeño</i> <i>mediano</i> <i>grande</i>	<u>7</u>
30. Fruto: forma (+)	<i>cónico</i> <i>cónico a cilíndrico</i> <i>cilíndrico</i> <i>elíptico</i> <i>globo-esférico</i>	<u>3</u>
31. Fruto: color antes de la madurez fisiológica, con fruta completamente formada	<i>verde plateado</i> <i>verde claro</i> <i>verde</i> <i>verde oscuro</i> <i>rojo</i> <i>r morado</i>	<u>4</u>
32. Fruto: color de la cáscara en el punto de consumo	(verde) (verde con puntos amarillos) (amarillo claro) (amarillo oro) (naranja rojizo) (morado)	<u>4</u>
33. Fruto: homogeneidad de la cáscara	<i>ausente</i> <i>presente</i>	<u>2</u>
34. Fruto: número de tallos basales frutales (+)	(ausente o muy bajo) (bajo) (intermedio) (alto) (muy alto)	<u>1</u>
35. Fruto: frutos desprendibles	<i>ausente</i> <i>presente</i>	<u>1</u>
36. Fruto: relieve del fruto	<i>plano</i> <i>prominente</i> <i>muy prominente</i>	<u>1</u>

37. Fruto: <i>color de la pulpa</i>	<i>blanco a crema</i> <i>amarillo</i> <i>amarillo oro</i> <i>anaranjado</i>	<u>3</u>
38. Fruto: <i>firmeza de la pulpa</i>	<i>suave</i> <i>intermedio</i> <i>firme</i>	<u>7</u>
39. Fruto: <i>fibrosidad de la pulpa</i>	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>
40. Fruto: <i>suculencia</i>	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>
41. Fruto: <i>diámetro del eje central</i> (+)	<i>pequeño</i> <i>mediano</i> <i>grande</i>	<u>7</u>
42. Fruto: <i>concentración de sólidos solubles (Grados Brix)</i> (+)	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>
43. Fruto: <i>acidez (fijado en porcentaje)</i> (+)	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>5</u>
44. Fruto: <i>sabor</i>	<i>débil</i> <i>intermedio</i> <i>fuerte</i>	<u>5</u>
45. Corona: <i>posición</i>	<i>erecta</i> <i>abierta</i> <i>decumbente</i>	<u>3</u>
46. Corona: <i>longitud</i> (+)	<i>corto</i> <i>intermedio</i> <i>largo</i>	<u>5</u>
47. Corona: <i>peso</i> (+)	<i>bajo</i> <i>intermedio</i> <i>alto</i>	<u>7</u>
48. Corona: <i>tendencia a corona múltiple</i>	<i>(ausente o muy bajo)</i> <i>(bajo)</i> <i>(intermedio)</i> <i>(alto)</i> <i>(muy alto)</i>	<u>3</u>

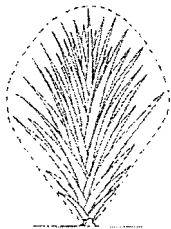
CARACTERÍSTICA COMPLEMENTARIA

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

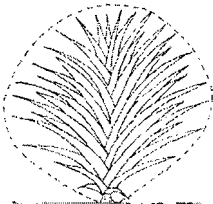
4

VI.
OBSERVACIONES Y FIGURAS

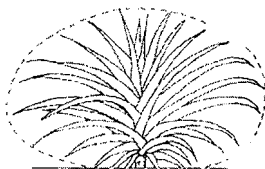
Característica 1. Planta: actitud



3
semi-erecta



5
intermediaria



7
abierta

Característica 2. Planta: número de hojas activas

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

Característica 3. Hoja: longitud

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

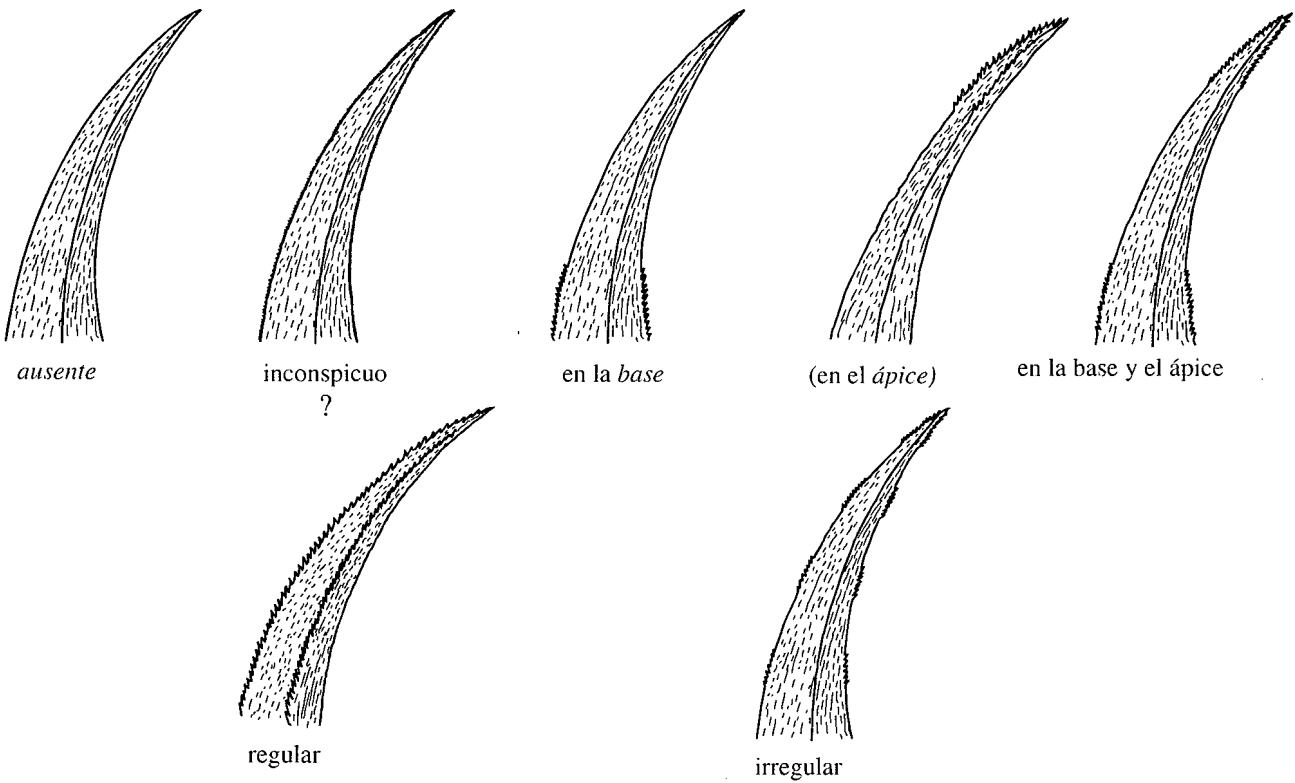
(largo) > 120 cm

Característica 4. Hoja: ancho

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

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

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



Característica 10. Inflorescencia: número de flores

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

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

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

Característica 18. Flor: longitud del estilo

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

Característica 19. Retoño: cantidad

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

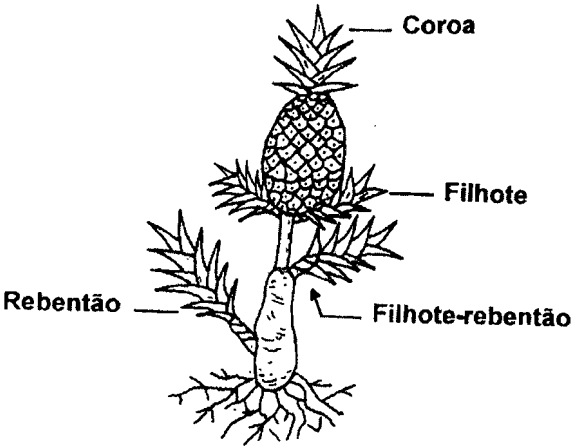
Característica 20 . Pedúnculo: longitud

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

Característica 21. Pedúnculo: diámetro en la parte central

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

Característica 22. Pedúnculo: cantidad de tallos



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

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

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

Característica 27. Fruto: diámetro de la base

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

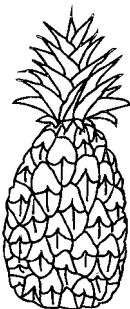
Característica 29. Fruto: diámetro de la punta

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

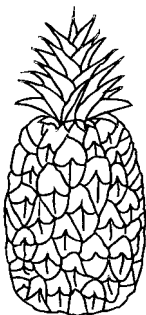
Característica 30. Fruto: forma



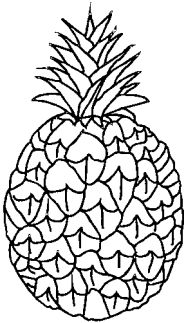
1
cónico



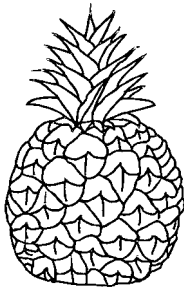
2
cónico a
cilíndrico



3
cilíndrico



4
elíptico



5
globosa

Característica 34. Fruto: numero de tallos basales frutales

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

Característica 41. Fruto: diámetro del eje central

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

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

(baja)	< 13
(intermedia)	13 – 16
(alta)	> 16

Característica 43. Fruto: acidez (fijado en porcentaje)

(baja)	< 0,5
(intermedia)	0,5 – 0,7
(alta)	> 0,7

Característica 46. Corona: longitud

(corta)	< 15 cm
(intermedia)	15 – 20 cm
(larga)	> 20 cm

Característica 47. Corona: peso

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

FIGURAS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams DO, Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):170-174.
2. Barker, R., Idler, K., Thompson, D., Kemp, J. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2:335-350.
3. Chalkoff, R. S., and Mauvais, C. J. (1984) Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224:1443-1445.
4. Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15a cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156
5. Cunningham, F.X., Pogson, B.J., Sun, Z., McDonald, K., DellaPenna, D., and Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613-1626.
6. Cunningham, F.X., Jr., and Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557-583.
7. DePicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H. M. (1983) Nucleotide sequences and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-511.
8. Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L., (1986) Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol. Gen. Genet.* 205, 14-22
9. Firoozabady, E. US Patent No. 8049067. Organogenic transformation and regeneration.
10. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-65
11. Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 210-218.
12. Hirschberg, I. M. Cohen, M. Harker, T. Lota, V Mann, and I. Pecker. 1997. Molecular genetics of carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 69:2145-2150.
13. Ikoma, Yoshinori, Akira Komatsub, Masayuki Kitae, Kazunori Ogawad, Mitsuo Omurae, Masamichi Yanoe and Takaya Moriguchi, (2001) Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 111: 232-238.
14. Itoh, Y., Watson, J.M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220.
15. Kocz, C. and Schell J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396
16. Lee, K. et al., (1988) The molecular basis for sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
17. Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D, Christopher DA. 2002. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science*, 165:1021-103 5.
18. Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. 4th ed., a. Wadsworth.
19. TURNBULL, C.G.N.; NISSEN, R.J.; SINCLAIR, E.R.; ANDERSON, K.L.; SHORTER, A.J. Ethephon and causes of flowering failure in pineapple. *Acta Horticulturae*, Honolulu, n.334, p. 83-88, out. 1993.
20. Young, T. and Firoozabady, E. 2010. United States Patent 7,663,021. Transgenic pineapple plants with modified carotenoid levels and methods of their production
21. Waters, S. H., Rogowski, P., Ginsted, J., Altenbuchner, J., and Schmidt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. *Nuc. Acids Res.* 11(17):6089-6105.
22. Wintz, H-C and Firoozabady, E. 2005. patent PUBLICATION NUMBER-2006113709/WO-A2 Plant promoters, terminators, genes, vectors and related transformed plants.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un proceso para desarrollar la piña Rosé (EF2-114) que comprende los siguientes pasos:
 - a. La piña (*Ananas comosus*) es transformada mediante una transformación de los tejidos organogénicos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*;
 - b. Las cepas de *Agrobacterium* se cocultivan con tejidos receptores de piña;
 - c. Las cepas de *Agrobacterium* logran tanto fenotipos con altos contenidos de carotenoides como de floración controlada, con un plásmido de transformación ya sea para aumentar la biosíntesis de carotenoides o para disminuir la biosíntesis de etileno;
 - d. Se seleccionan los tejidos transformados en medios que contienen closulfuron y posteriormente se revisan para detectar la presencia de genes diana mediante PCR;
 - e. Se insertan diferentes genes en el ADN-T en un vector binario para la introducción a la piña;
 - f. El Psy derivado de *Citrus reticulata*, mandarina se usa para codificar una enzima que convierte geranilgeranil pirofosfato (GGPP) en cis-fitoeno, un intermediario en la biosíntesis de licopeno y beta-caroteno;
 - g. El gen licopeno beta-ciclasa (Lyc-b) derivado de la piña *Ananas comosus*, codifica una enzima que convierte el licopeno en gama-caroteno, un precursor metabólico del beta-caroteno;

- h. El gen licopeno ciclasa épsilon (Lyc-e) derivado de la piña *Ananas comosus*, codifica una enzima que convierte el licopeno en sigma-caroteno, un precursor metabólico del alfa-caroteno;
 - i. El gen modificado (surBHRA) acetolactato sintasa (ALS) derivado del tabaco *Nicotiana tabacum* incentiva la ingeniería genética del MD2:
 - j. Se producen plantas transgénicas y se propagan en cultivo de tejidos;
 - k. Los propágulos resultantes se evalúan en campo, para la propagación en el campo y para la propagación en masa de esta variedad en el laboratorio.
2. Una variedad nueva y distinta de la planta *Ananas comosus* llamada "Rosé" con el varietal de EF2-114.

RESUMEN DEL INVENTO

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

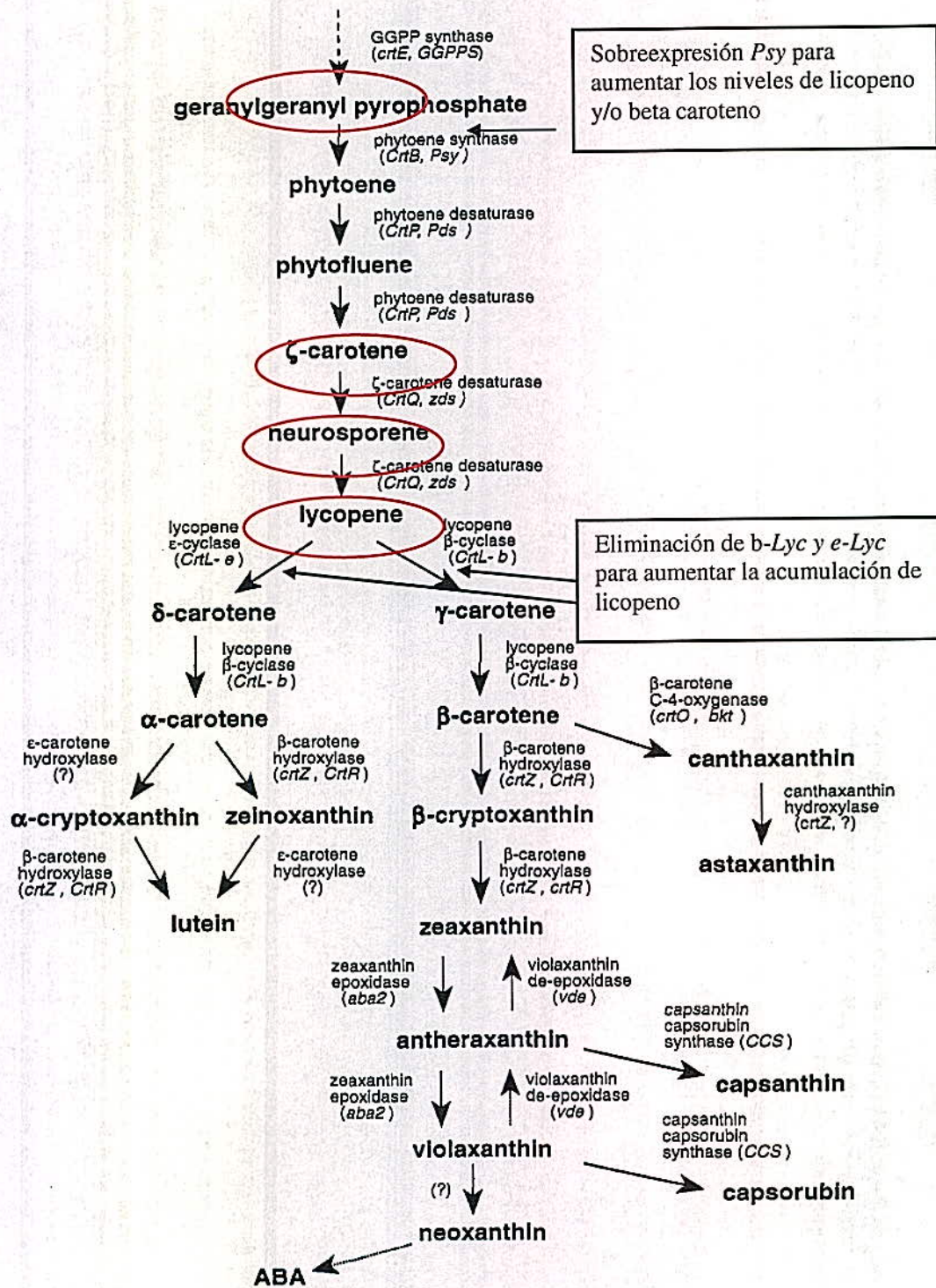


Fig. 2 – Vía de la biosíntesis de etileno en plantas

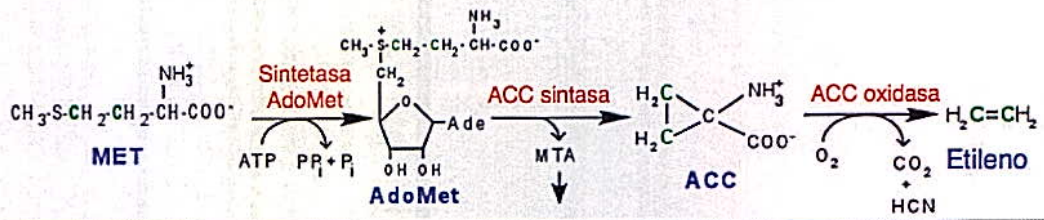


Fig. 3. El mapa del vector binario del plásmido, pHCW1, que se usa en el proceso de ingeniería genética de la piña.

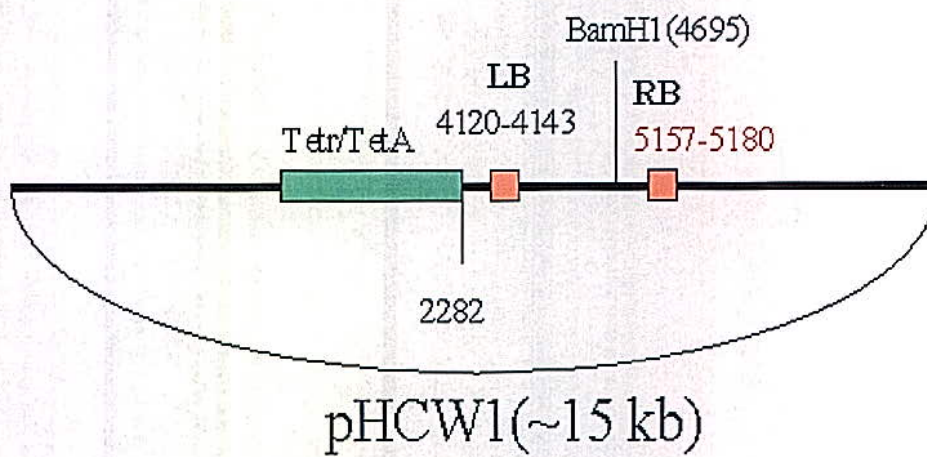


Fig. 4. El ADN-T en el plásmido pHCW1 es la estructura común para crear el vector binario pHCW.T-7 (en AG76) y el vector binario pHCWflACC3'-2 (en AG62).

Diagrama Esquemático de la Región de ADN-T de AG76

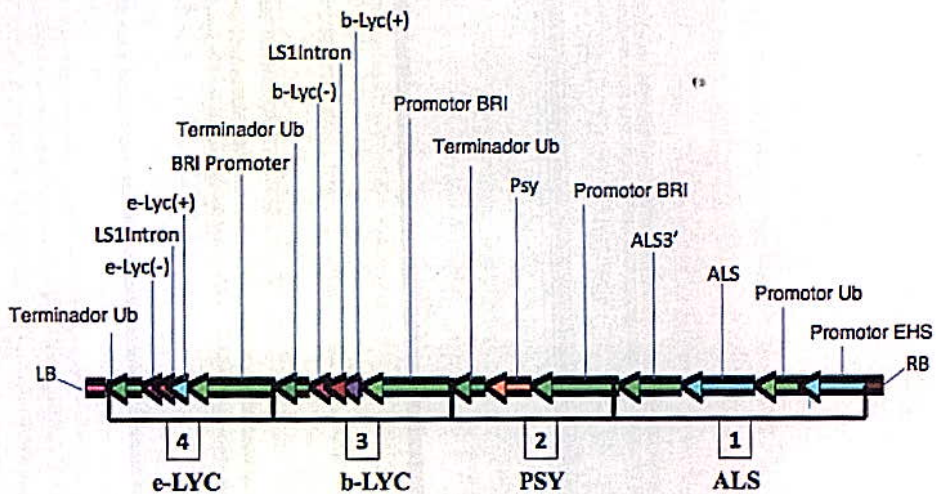


Diagrama Esquemático de la Región de ADN-T de AG62

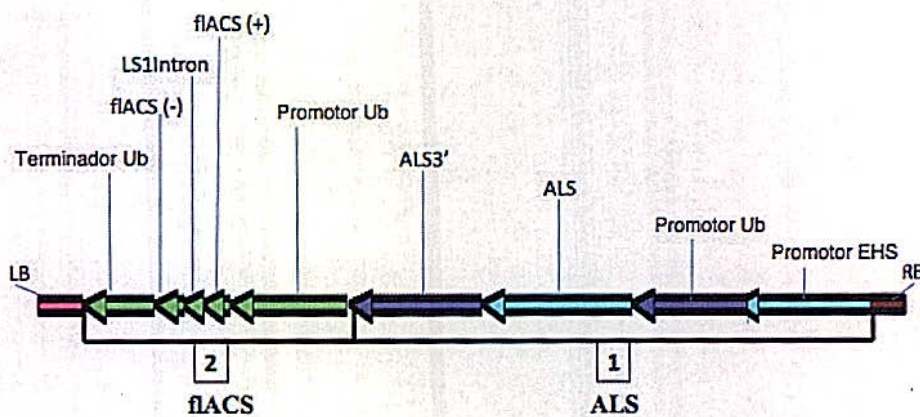


Fig. 5. Se muestra el color interno de las frutas que va de rosa a rojo debido a la acumulación de licopeno.



Fig. 6. Se muestra el color de la cascara “Tigre” en las frutas EF2-114. El color de la cascara presenta una combinación de colores verde, amarillo, naranja, rojo y marrón en el borde de cada frutículo en desarrollo.

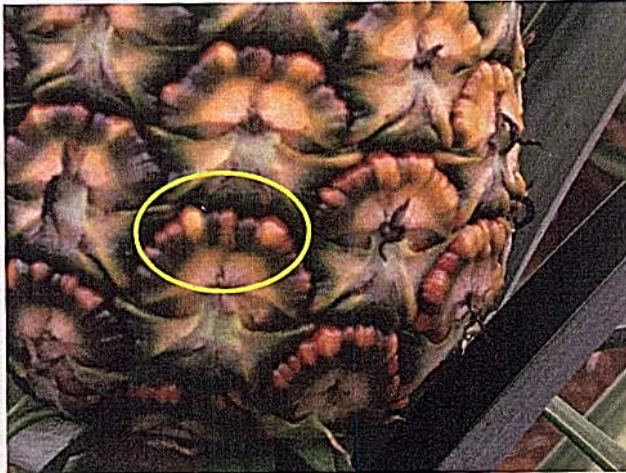


Fig. 7. Una fruta "Tigre" que muestra la cascara y el color interno al momento de su cosecha.

Área expuesta



Área a la sombra



Fig 8. Se muestra una fruta inmadura de 'Rosé' con morfología de la cáscara tipo Tigre (izquierda) y una fruta inmadura de MD2 (derecha) ambas ~a aproximadamente 145 días después de forzamiento.

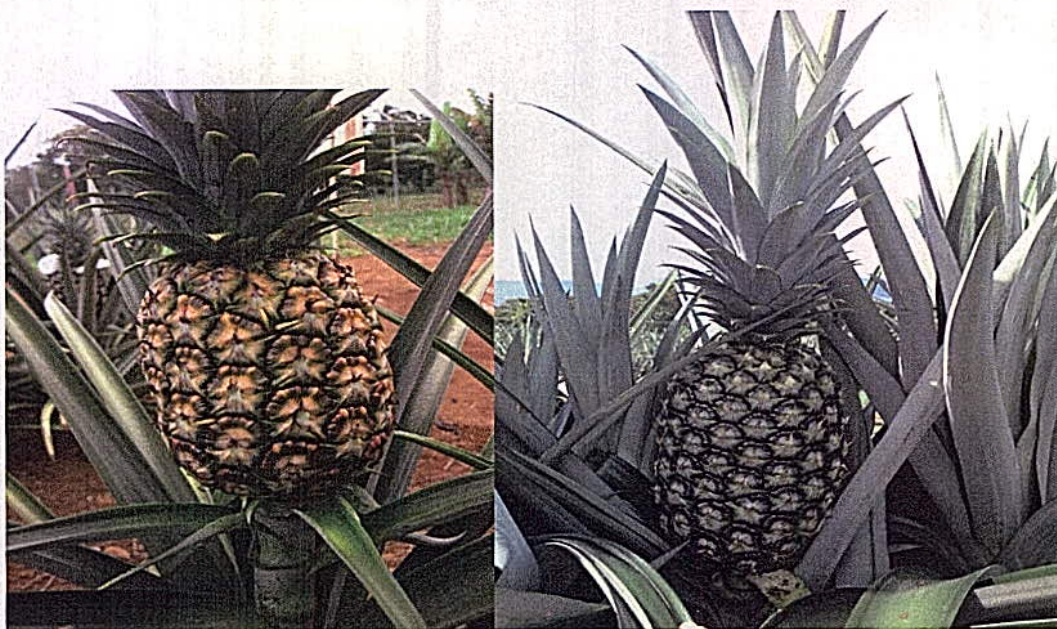


Fig. 9. Se muestra la vista desde arriba de una planta 'Rosé' EF2-114.



Fig. 10. Se muestra una plantación de 'Rosé' EF2-114.



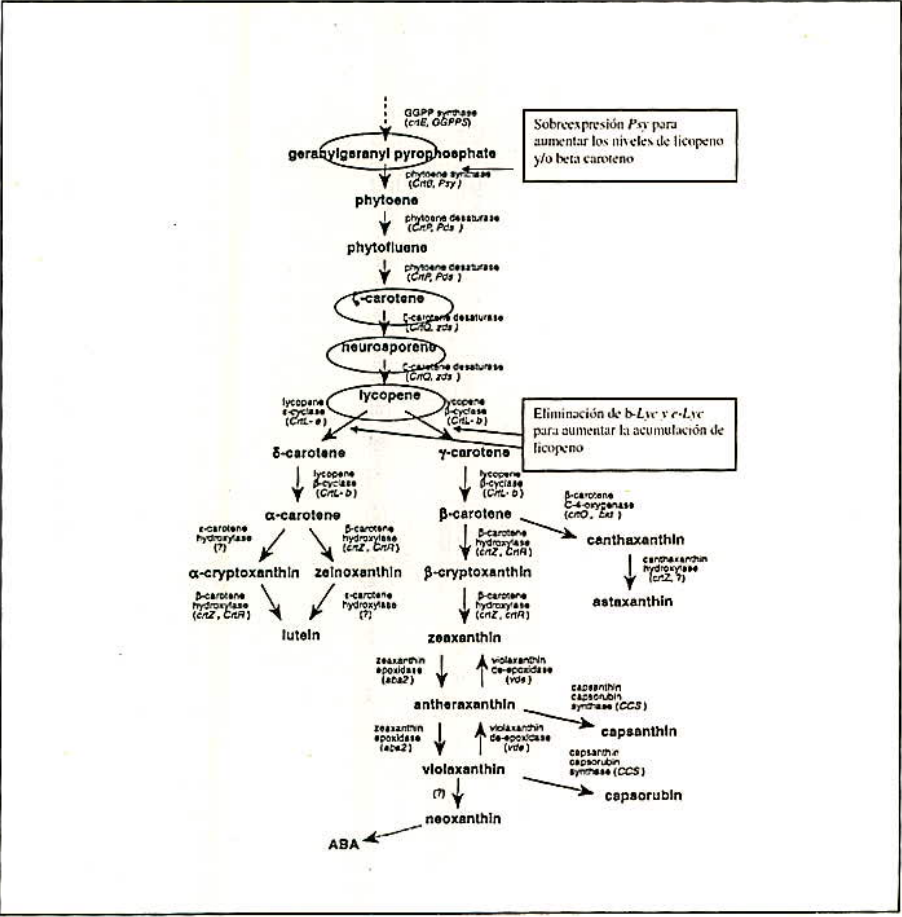
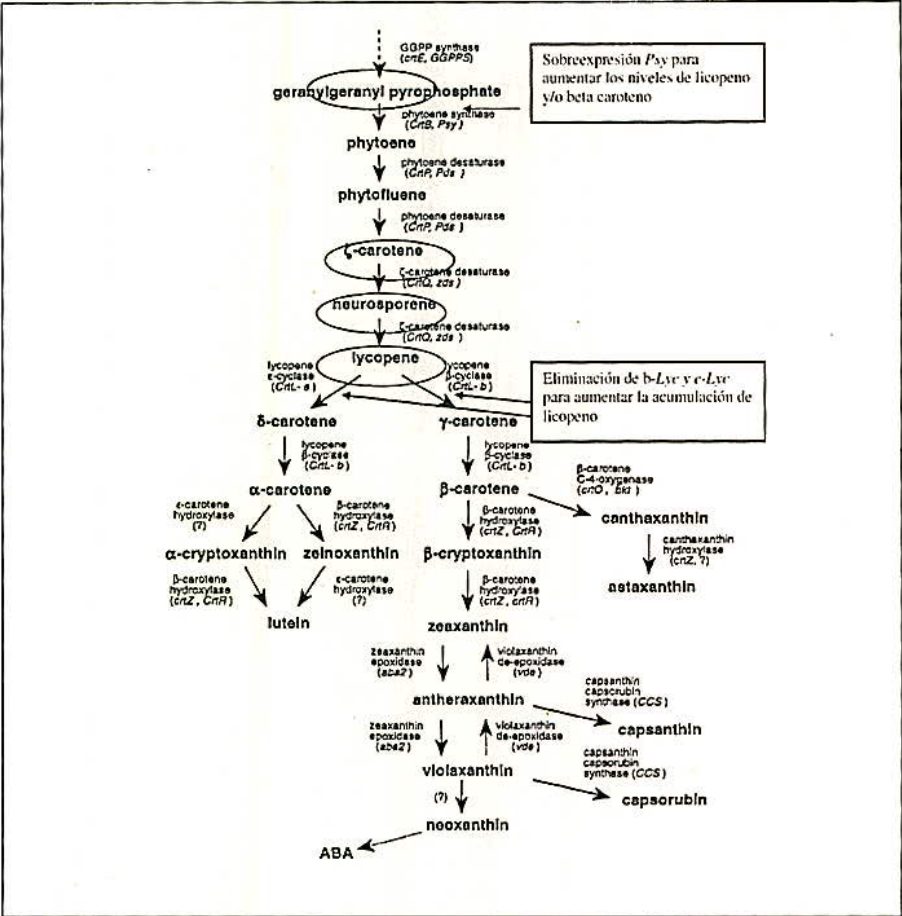
Fig 11: Se muestran parcelas experimentales de EF2-114 (izquierda) y MD2 (derecha).



Fig 12: Se muestran plantas EF2-114 (izquierda) y MD2 (derecha) provenientes de la técnica de cultivo de tejidos. Después de 15 semanas de crecimiento en vivero, las plantas

de proximádamente 15 cm de largo se trasplantan a macetas. Las fotos fueron tomadas 11 meses después.





PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☒ Indicación que se solicita una patente.

☒ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☒ Descripción de la invención

☒ Dibujos de ser estos pertinentes

☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño Industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

FIN2-FPA (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-116147- -00000-0000

Fecha: 2013-05-09 13:48:16

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 2 PATENTES

Eve: 1 REGDEPOSITO

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 46