



1

1/41

TMTAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

PATENTE INVENCION:

EXPEDIENTE :04-088188

ACTUACIÓN : MEMORIAL DE ALCANCE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-088188- -00013-0000

Fecha: 2011-04-27 15:30:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 329 CTOINFORMACION Follos: 41

Estimados señores:

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado con la Cédula de Ciudadanía No.17.117.818 expedida en Bogotá, Abogado en ejercicio y portador de la Tarjeta Profesional No. 17.402 el Consejo Superior de la Judicatura, obrando en calidad de apoderado de la Universidad Tecnológica de Pereira, domiciliada en Pereira (Risaralda), según poder debidamente conferido y legalizado, adjunto a las diligencias administrativas de la referencia, **doy alcance a la patente citada**, con el fin de aportar:

- Copia simple del memorial radicado ante el Ministerio de Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial el 18 de noviembre de 2010 solicitando autorización de contrato de acceso a recursos Genéticos para investigación.
- Copia de la respuesta al requerimiento formulado por el Ministerio de Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial, radicado el pasado 28 de enero de 2011 con sus anexos



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

- Copia simple de la consulta sobre contrato de acceso a recursos genéticos radicada ante el Ministerio de Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial el 13 de abril del año en curso.

Respetuosamente solicito, se tengan en cuenta los anexos aportados como prueba de los trámites adelantados ante la entidad competente para lo relacionado con el manejo de los Recursos Genéticos en Colombia y se ordene lo pertinente para que el expediente en mención, siga su curso normal, hasta su concesión.

Del señor Jefe,

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ

No.17.117.818 expedida en Bogotá,

T.P No. 17.402 del C.S.J.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com

COPIA



TM TAMAYO

ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

Bogotá, 18 de noviembre de 2010.

Señores

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA
Y DESARROLLO TERRITORIAL

Atn. Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales
Bogotá D.C.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO T.
18/11/2010, 16:13:44 FOLIO: 3 ANEXOS: 1
AL CONTESTAR CITE: 4120-E1-149087
TIPO DOCUMENTAL: SOLICITUD
REMITE: TM TAMAYO
DESTINATARIO: DIRECCION DE LICENCIAS PERMISOS Y TRAMITES
AMBIENTALES

REF. SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE CONTRATO DE
ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS PARA INVESTIGACIÓN

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 17.117.818 expedida en Bogotá, Abogado titulado y en ejercicio y portador de la Tarjeta Profesional No. 17.402 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando en calidad de apoderado de la UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, según poder debidamente conferido, adjunto a la presente diligencia administrativas.

Por medio de la presente, de manera respetuosa solicito a ustedes se sirvan tramitar la Autorización que nos permita obtener Contrato Acceso a Recursos Genéticos, para la solicitud de la investigación denominada "JUEGO DE PRIMERS ARTIFICIALES SINTÉTICOS Y PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR UN MARCADOR DE SEXO MASCULINO EN PLANTAS DE BOROJO"; declaro que todos los datos suministrados en la presente solicitud son verdaderos.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO

ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

Como soporte adjunto los siguientes documentos:

1. Formato diligenciado de solicitud de Acceso a Recurso Genéticos
2. Razón social, número de identificación, domicilio y nacionalidad del solicitante.
3. Nombre del representante Legal.
4. Poder debidamente otorgado por la Universidad Tecnológica de Pereira.
5. Certificado de existencia y representación legal de la Universidad Tecnológica de Pereira.
6. Copia de firmas de la Comunidad de Zabaletas donde expresan su interés por el proyecto "Determinación del Sexo del Borojo (Borojoa patinoi) mediante marcadores moleculares, se anexa fotografías sobre la sensibilización del proyecto.
7. Copia del Acta de Acuerdo, suscrita entre el Consejo Comunitario de Zabaletas y la UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.
8. Carta Aval de la entidad Nacional de Apoyo -INA- expedida por la Universidad Nacional de Colombia
9. Declaración juramentada donde consta la veracidad de los datos suministrados.
10. Proyecto de investigación
11. Identificación y curriculum vitae de los responsables del proyecto.
12. Datos de identificación de la Institución Nacional de Apoyo -INA-
13. Ámbito geográfico para al acceso a recurso genéticos
14. Carta del Instituto Geográfico Agustín Codazzi donde se encuentra ubicada la región de Zabaletas.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO

ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

15. Certificación de Grupos Étnicos, expedida el 9 de marzo de 2009,
por la Coordinadora Grupo de Consulta Previa del Ministerio del
Interior y de Justicia Dra. Claudia Teresa Cáceres Domínguez.

Con la debida consideración me permito informarles que recibiré lo del
caso en mi Oficina de Abogado ubicada en la Carrera 13A No. 28-38
Ofc. 230 MZ. 2 Parque Central Bavaria de la ciudad de Bogotá D.C., o
en su despacho.

Atentamente,

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ

No. 17.117.818 expedida en Bogotá

T.P No. 17.402 del C.S.J.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com

ANEXOS
11/35

COPIA

Señores:

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA
Y DESARROLLO TERRITORIAL

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO T.
20/1/2011 14:53:3 FOLIOS: 1 ANEXOS: 1
AL CONTESTAR CITE: 4120-E1-8897
TIPO DOCUMENTAL OFICIO
REMITE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ
DESTINATARIO: DIRECCION DE LICENCIAS, PERMISOS Y TRAMITES

Atn. Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales
Bogota D.C.

**REF. SOLICITUD DE CONTRATO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS
RADICADO 4120-E1-149067 DEL 26 DE NOVIEMBRE DE 2010- COR 3439-10
RESPUESTA A REQUERIMIENTO: 2400-2-149067**

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, identificado como aparece al pie de firma, obrando en calidad de apoderado de la UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, según poder que reposa en el expediente, me permito dar respuesta al oficio de requerimiento citado en la referencia emanado de esa oficina con fecha 30 de noviembre del año 2010, encontrándome dentro del termino legal, aportamos:

Se adjunta nuevamente el formulario de acceso a recursos genéticos modificando y adicionado al departamento de Risaralda. Esto nos permite obviar los requisitos de Sabaletas.

También le remito el formulario de permiso para trabajar en diversidad biológica en el departamento de Risaralda.

Nosotros establecimos un cultivo de Borojó en la Universidad Tecnológica de Pereira con unas semillas que se compraron en el Almacén la 14 de Pereira (Risaralda) de allí en adelante las pruebas se han realizado con material vegetal recolectado en el departamento de Risaralda, además tenemos 10 árboles adultos que nos ha permitido tomar muestras en estos árboles. Estos árboles se cultivan en la Virginia. Entonces, introdujimos dos sitios de recolección de muestras. La Virginia Risaralda y el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

7
2

Lo anterior por cuanto en un principio se intento realizar el estudio en Sabaletas, pero por razones de orden publico, difícil acceso y sobre todo porque en este mismo departamento se encontraron árboles de Borojo, se decidió no realizar el muestreo allá e incluso, se empezó un cultivo de la especie en el mismo Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Por lo anterior y teniendo en cuenta que materialmente, la investigación y el muestreo se han realizado en Risaralda y en las mismas instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira, debemos mirar de forma urgente, la manera de cambiar todos los requerimientos realizados en relación con Sabaletas, sobretodo sabiendo que en el nuevo cronograma y los demás documentos enviados, solo dan cuenta de muestreos en este departamento.

Con la debida consideración me permito informarles que recibiré lo del caso en mi oficina de abogado ubicada en la carrera 13A No. 28-38 Ofc. 230 Mz. 2 Parque Central Babaria de la ciudad de Bogota D.C., o en su despacho.

Atentamente:



CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ
CC. 17.117.818 de BOGOTA
T.P. 17.402 del C.S.J.

SOLICITUD DE ACCESO A RECURSOS GENETICOS

IDENTIFICACION

I. SOLICITANTE O REPRESENTANTE LEGAL

I.1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social: Luis Enrique Arango Jiménez

Nacionalidad : Colombiana

Documento de Identidad : 10.059.486

Domicilio Legal: Universidad Tecnológica de Pereira

Teléfono: .3137300 Fax: 3213206 Correo Elect: rector@utp.edu.co

II. RESPONSABLE TECNICO DEL PROYECTO

1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social: Lucero Rengifo Ramos

Nacionalidad : Colombiana

Documento de Identidad : 31.258.109

Domicilio Legal : Universidad Tecnológica de Pereira

Teléfono: 3215393 Fax.: 3215393 ext 12.

Correo Elect: cenbiotep@utp.edu.co

2. ACTIVIDADES DE ACCESO REALIZADAS EN LOS ULTIMOS 5 AÑOS DEL RESPONSABLE TECNICO

R/ NINGUNA

3. CURRICULUM DE ESTUDIOS DEL RESPONSABLE TECNICO

AÑO	ESTUDIOS SUPERIORES (ESPECIALIDAD)	GRADO	INSTITUCIÓN	LUGAR
2008	Magister en Biología Molecular y Biotecnología	Magister	Universidad Tecnológica de Pereira	Pereira/Risaralda
1996	Especialista en Genética clínica	Especialista	Hospital Infantil de Mexico	Mexico/DF
1976	Biología-Ciencias	Bióloga	Universidad del Valle	Cali/Valle

4. PUBLICACIONES DEL RESPONSABLE TECNICO (Tres más Importantes)

TITULO	AÑO	REVISTA/LIBRO
Depressive symptoms associated with hereditary Alzheimer's disease: a case description	2007	American journal Alzheimer's disease Volumen 21 No. 6 pag 411
Gran variabilidad de los alelos FMR2 en una población normal del departamento de Risaralda	2004	Revista Médica de Risaralda V.10 N. 2 pag 3
Frecuencia elevada Del alelo epsión 4 del gen de la apolipoproteína E en una muestra de pacientes con síndrome Down	2002	Revista Médica de Risaralda v.8 N1. pag 11

5. EXPERIENCIAS DEL RESPONSABLE TECNICO (Actividad realizada en los últimos 5 años)

ANO	ACTIVIDAD	CANTIDAD	PAIS
Desde 1996	Docente investigadora del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira	Hasta la fecha	Colombia
Desde 2003	Coordinadora administrativa de la Maestría en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira	Hasta la Fecha	Colombia
Desde 1981	Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira	Hasta la fecha	Colombia

6. GRUPO DE TRABAJO A CARGO DE LA ACTIVIDAD DE ACCESO

DOMICILIO	NOMBRE	ESPECIALIDAD	GRADO ACADEMICO
Carrera 15 #36-82 casa 7 Pereira/Risaralda	Alvaro Hernán Alegría Soto	Biología Molecular y Bioquímica	Doctor
Carrera 15 #36-82 casa 7 Pereira/Risaralda	Lucero Rengifo Ramos	Biología Molecular y Biotecnología	Magister
Tejares de la Loma, Manzana 12 Casa 5, Dosquebradas/Risaralda	Clara Inés Giraldo	Biología	Bióloga
Vereda Tribunales, Finca el Pital KM 7 Via Armenia	Enrique Aguilar Fernandez	Biología	Biólogo
Tejares de la Loma, Manzana 12 Casa 5, Dosquebradas/Risaralda	Duverney Gaviria Arias	Biología Molecular y Biotecnología	Magister

III. DATOS DE LOS PROVEEDORES DEL RECURSO

1. IDENTIFICACION

a) Nombre o Razón Social : Jorge Rodríguez Rueda

Documento de Identidad : c.c. 10. 071473

Domicilio : Condominio campestre, La virginia (Risaralda)

Teléfonos: (63) 3161661 - Teléfono celular: 3148001969

b) Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira

Domicilio: Universidad Tecnológica de Pereira.

Teléfono: (63) 3137300 Fax.: (63) 3213206 www.utp.edu.co

IV. DATOS DE LA PERSONA O ENTIDAD NACIONAL DE APOYO CIENTIFICO O CULTURAL

1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social: Instituto Nacional de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

Domicilio Legal: Universidad Nacional de Colombia. Avenida 30 # 45-03 Edificio Manuel Ancizar

Teléfono: 3165000, ext 15961 Fax: 3165000 ext 15961

Correo Elect. ibun@unal.edu.co

V. PROPUESTA DE PROYECTO

Ver anexos adjuntos

1. TÍTULO:
2. JUSTIFICACION, OBJETIVOS Y LITERATURA TECNICA
3. AREA DE APLICACIÓN
4. TIPO DE ACTIVIDAD Y USOS QUE SE DARÁ AL RECURSO
5. LISTA DE REFERENCIA DE RECURSOS GENÉTICOS, PRODUCTOS DERIVADOS Y COMPONENTES INTANGIBLES ASOCIADOS, A LOS QUE SE PRETENDE ACCEDER (NOMBRE CIENTÍFICO, NOMBRE VULGAR Y NÚMERO DE MUESTRAS)
6. LOCALIZACION DE LAS AREAS DE ACCESO Y DE REALIZACION DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO (COORDENADAS)
 - a) DE RECOLECCION
 - b) UBICACION DEL AREA DE ACCESO

In Situ	X	Ex Situ	Coordenada
---------	---	---------	------------
- Detalle:
 - c) LUGAR DE PROCESAMIENTO Y/O USO DEL MATERIAL GENETICO, LOCALIZACIÓN
- EN CASO DE RECURSOS EX SITU SE INCLUIRÁ LA INFORMACION RELEVANTE SOBRE EL CENTRO DE COMERCIALIZACION EX SITU.
7. CRONOGRAMA INDICATIVO (Ver en anexos)
8. MATERIALES Y MÉTODOS (Ver en anexos)

9. PROCEDIMIENTO DE EXPLORACION Y RECOLECCION (Ver en anexos)

10. MANEJO DE LA MUESTRA (Ver en anexos)

11. EVENTUALES RESULTADOS ESPERADOS (Ver en anexos)

12. PRESUPUESTO INICIAL (Ver en anexos)

13. OTROS (Ver en anexos)

VI. CARTA DE ACEPTACION EN PRINCIPIO O CONTRATO DEL PROVEEDOR DE LOS RECURSOS BIOLOGICOS, DE LOS RECURSOS GENETICOS O DEL COMPONENTE INTANGIBLE (Ver anexos)

VII. CARTA DE COMPROMISO DE LA PERSONA O ENTIDAD NACIONAL DE APOYO (Ver anexos)

VIII. DECLARACION JURADA O AFFIDAVIT DEL SOLICITANTE, CONSIGNANDOLA VERACIDAD DE LOS DATOS ANOTADOS EN LA SOLICITUD (Ver anexos)

ANEXOS

1. TITULO

DETERMINACIÓN DEL SEXO EN BOROJÓ (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

2. JUSTIFICACION

A nivel nacional, en los últimos años, el consumo del fruto de borojó se ha incrementado grandemente, debido a las características alimenticias y las propiedades que la medicina tradicional y popular le han atribuido, lo que ha aumentado paralelamente el precio del fruto ubicándolo en una posición privilegiada como fruto tropical promisorio económicamente.

El borojó es un árbol tropical originario del departamento del Chocó y su fruto tiene características de interés alimenticio, medicinal e industrial:

Tiene propiedades organolépticas (sabor y aroma) que hacen de su jugo una bebida refrescante y agradable.

Tiene propiedades alimenticias por poseer aminoácidos esenciales y es fuente de calcio, hierro, fósforo y vitamina C. Posee metabolitos secundarios de gran interés (sesquiterpenlactonas con propiedades citotóxicas) como modelos químicos para nuevas drogas. Además, posee propiedades que le atribuye la medicina tradicional y popular como diurético, cicatrizante, afrodisíaco y antitumoral.

Por otra parte, el cultivo del borojó se puede utilizar en la recuperación de suelos degradado por la minería y permite una utilización económica de la selva sin perturbar el equilibrio de los sistemas naturales de organización biológica sin reñir con la fragilidad de los ecosistemas ni con la cultura del habitante del Pacífico (Mosquera y Arenas , 1995). No se le conocen agentes patógenos, ni ataques de insectos diferentes a la hormiga arriera (*Atta cephalotas*. Ver) y la larva de un lepidóptero no identificado que devora las hojas del árbol durante el mes de junio.

En la actualidad el borojó se propaga por semillas. Sin embargo la planta es dioica y la población de árboles macho, no productores de frutos, no es fácilmente diferenciable de las hembras. De hecho es imposible separar los árboles machos de las hembras en el momento de establecer el cultivo, ya que las características

sexuales solo se reconocen en la edad de floración. Esta situación no permite estimar la producción global por árbol por hectárea, debido a la incertidumbre respecto a la cantidad de árboles hembras y machos sembrados, generando una baja productividad natural del cultivo por número de árboles por hectárea. Con mucha frecuencia, cuando se establecen cultivos de borojó, el número de árboles machos por hectárea es aproximadamente del 60%, generando una baja producción. (conversación personal con cultivadores y granja experimental Universidad Tecnológica del Chocó, Lloró)

Como no existe un método basado en las características morfológicas para distinguir las plantas femeninas de las masculinas antes de la edad de floración., se requiere entonces un método basado en caracteres citogenéticos o moleculares que permite establecer cultivos comerciales eficientes y sostenibles.

Por esta razón, el presente proyecto pretende utilizar las técnicas de marcadores moleculares para determinar los caracteres sexuales de la planta en edad temprana de forma que se puedan establecer cultivos comerciales con características definidas.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología para la identificación de marcadores moleculares ligados a la determinación del sexo en Borojó.

2.1.2 Objetivos específicos

- a) Aplicar la técnica AFLPs para obtener marcadores ligados al sexo en borojó.
- b) Definir tempranamente el sexo de las plantas de borojó.
- c) Basados en la información obtenida de los AFLPs desarrollar una técnica más sencilla como la PCR para la identificación del sexo a plantas de vivero para cultivos comerciales.

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 Antecedentes

El borojó es una especie perteneciente a la tribu Gardenieae, género Magnoliopsida, orden Rubiales, familia Rubiaceae, especie *Borojoa patinoi* (Cuatrecasas, 1948), propia del sotobosque selvático del interior del departamento del Chocó (cuenca media alta de los ríos Atrato, San Juan y Baudó), República de Colombia, Sur América y distribuido en el Chocó biogeográfico. Esta región

situada en la zona de tierras bajas selváticas de la región comprendida entre el Océano Pacífico por el occidente, la cordillera occidental de los Andes en el oriente y desde el sur de Panamá por el norte hasta el noroccidente del Ecuador en el sur, incluye los departamentos del Chocó, Valle del Cauca, Cauca, Nariño y el occidente de los departamentos de Antioquia y Risaralda con una extensión de 75.000 Km² y 817.000 habitantes. El departamento del Chocó cubre 47.000 km² (Departamento Nacional de Planeación, 1992), con una precipitación anual de 11 m por año y temperatura promedio de 35°C (Gentry, 1982, 1988). Dicha región es la más biodiversa del mundo, con el 16% de la flora angiosperma (Forero y Gentry, 1989) y en ella se ha estimado que existen entre 5000 y 8000 especies de plantas endémicas (Gentry, 1982).

El borojó permite una utilización económica de la selva, sin perturbar el equilibrio de los sistemas naturales de organización biológica y sin refir con la fragilidad de los ecosistemas, ni con la cultura del habitante del Pacífico. Además, teniendo en cuenta las expectativas de mercadeo alrededor de la fruta en el ámbito nacional e internacional, la proyección comercial muestra una rentabilidad superior o igual a la de ciertos cultivos comerciales de la zona andina e interandina.

El borojó siempre ha estado asociado con huertas caseras de las familias campesinas chocoanas en su área de dispersión. La producción en este caso bajo condiciones naturales, con técnicas del saber tradicional y sólo con el aporte de las crecientes ribereñas es de 5 a 12 frutos árbol/año durante los primeros 5 años de vida productiva y de 12 a 30 frutos /árbol/año para el resto del periodo de utilidad (Mosquera y Arenas, 1995).

El área sembrada de borojó en 12 municipios del departamento del Chocó (Tadó, Lloró, Bagadó, Istmina, Condotó, Bajo Baudó, Alto Baudó, Nóvita, San José del Palmar, Nuquí, Acandí y Quibdó), es de 1.198 hectáreas, de las cuales se cosechan 1.117 Ha, con un rendimiento promedio de 4.531 Kg/Ha, para un total ofrecido de 5.061 toneladas al año (Mosquera y Arenas, 1995).

El fruto del borojó fisiológicamente maduro presenta condiciones excepcionales para la farmacopea, la agroindustria y la alimentación.

Los análisis químicos muestran que el fruto del borojó tiene altos contenidos en fósforo, hierro, calcio, aluminio, sodio, potasio, manganeso, boro, cobre, molibdeno, vitaminas B1, B2, B6, B12 y C, carbohidratos y la presencia de aminoácidos como triptófano, lisina, cisteína, leucina, fenilalanina, metionina, tirosina, prolina, alanina, ácido glutámico, glutamina, serina, glicina y arginina. (Instituto Nacional de Nutrición, 1967)

Se han identificado en el borojó grupos de metabolitos secundarios como triterpenos (sesquiterpenolactonas), esteroides, taninos, flavonoides, saponinas, nasfo y antraquinonas. (Frutales Silvestres del Chocó, 1985)

Desde el punto de vista medicinal ha sido un pilar fundamental de la evolución cultural del pueblo chocoano, ya que los indígenas Chocoes lo seleccionaron y lo adaptaron para embalsamar cadáveres, práctica que continuaron las comunidades negras en las provincias del Atrato y San Juan, siendo este el primer uso medicinal de la fruta del borojó. Se utilizó también en la primera fase en el ritual de iniciación de la pubertad (en forma de chicha como bebida alcohólica).

Al producirse la interacción entre el indio y el negro africano, se avanzó mucho más en la domesticación de la planta y aparecieron otros usos del fruto bajo la forma de emplastos para curar afecciones renales, pulmonares y como cicatrizante. Se afirma que controla la presión sanguínea, el colesterol y los niveles de azúcar en la sangre y se utiliza para aumentar la potencia sexual y para combatir la desnutrición. Estos usos han ido generalizándose entre los chocuanos de origen africano. Actualmente se utiliza para producir un vino de muy buena calidad.

2.2.2 Descripción de árbol del Borojó

El **Borojó** es un árbol de tamaño mediano que alcanza hasta 5 metros de altura cuando está bajo sombra y a plena exposición generalmente no pasa de 3.5 metros. El tronco, no excede de los 8 cm. de diámetro, tiene la corteza recubierta de una epidermis escamosa caediza que se dispone en tiras en el sentido del caule. Se ramifica simétricamente desde pocos centímetros del suelo, en ejemplares cultivados a plena exposición solar. Las ramas primarias son opuestas y forma sendas horquetas en ángulo agudo. Las hojas, más bien grandes elíptico-lanceoladas, de un verde brillante en el haz y más atenuado en el envés, son también opuestas, glabras, péndulas y flotantes cuando tiernas y después rígidas, contraste que le da un aspecto altamente ornamental al follaje, sobre todo en ejemplares jóvenes; en la prefoliación están protegidas por dos estípulas membranosas, opuestas. Es una especie dioica. Las inflorescencias masculinas son terminales, en forma de capítulos, rodeadas de un par de brácteas, con flores de corola tubular, de color blanco cremoso, implantada en un cáliz corto y grueso, anguloso por la recíproca compresión en la inflorescencia. Por lo general poseen cinco estambres, de anteras lineales y filamentos filiformes estrechamente aplicados a la pared de corola y ovario nulo. Las flores femeninas son también terminales, solitarias, de corola semejante a la de las flores masculinas, pero implantada en el cáliz, el cual corona el ovario abultado en forma de barril, lo que da a la flor fecundada, después de la caída de la corola, cierta apariencia de una pequeña granada. El fruto es una baya carnosa, de unos 10 cm. de longitud y de anchura insensiblemente menor, globoso o pomiforme, algunas veces ligeramente piriforme, con ápice invaginado en forma de ombligo, rodeado de una fimbria apergaminada, emergente en el fruto interno y que se va doblando hacia adentro hasta obturar parcialmente dicha cavidad a medida que el fruto se desarrolla, y que se borra y ennegrece en la madurez. Es verde claro al principio y de color sepia, acanelado o marrón cuando maduro. Su cáscara es delgadísima, adherente lisa y brillante primero, opaca en el fruto que ya ha llegado a su máximo desarrollo y empieza a cubrirse de máculas irregulares del mismo color de la pulpa cuando

se acerca a la madurez. La pulpa, que constituye la mayor parte del fruto (86%), que está formada por el mesocarpo y el endocarpo unidos sin solución de continuidad, es al principio blanca y esponjosa y en la madurez de color castaño oscuro o marrón más acentuado que el de la cáscara, muy untuosa y adherente al tacto, intensamente fragante con olor sui-generis. Las semillas son numerosas y de forma irregular, aplastadas, con cutícula muy dura y rugosa y albumen córneo, agrupadas en unos seis paquetes placentarios irregulares dentro del endocarpo (Cuatrecasas, 1948).

2.2. 3 Marcadores ligados a la determinación del sexo

El dioicismo es una regla en la mayoría de los animales. En el reino vegetal, sin embargo, se encuentra solamente aproximadamente en el 4% de las angiospermas (Yampolsky y Yampolsky, 1922), aunque la frecuencia puede ser indeterminada porque no se conoce mucho de las especies tropicales donde la existencia puede ser mayor que en otras zonas del globo (Bawa, 1980). El dioicismo se presenta independientemente en diferentes familias y géneros (Westergaard, 1958), y en diferentes especies de plantas se han encontrado varios mecanismos genéticos de regulación (Irish y Nelson, 1989; Durand y Durand, 1990). En contraste con la situación encontrada en animales, en donde los cromosomas sexuales diferenciados típicamente controlan el dioicismo, el heteromorfismo cromosómico en especies dioicas de plantas es la excepción más que la regla. El género *Silene*, el cual tiene un bien caracterizado sistema cromosómico masculino XY y femenino XX, es uno de los pocos géneros de plantas en donde el sistema aparece similar al de los animales. La presencia de cromosomas sexuales se ha reportado para otras angiospermas dioicas (Westergaard 1958; Lewis y John 1968; Parker y Clark 1991), en los géneros *Humulus* y *Rumex*. Con mucha frecuencia, el sexo en especies de plantas dioicas es controlado por la expresión de alelos de uno o varios loci (Irish y Nelson, 1989) especialmente en los géneros *Sparagus*, *Vitis*, *Spinacia*, y *Mercuriales*. En la mayoría de las especies examinadas en detalles, el estudio de la determinación del sexo es complicado por la presencia de alelos adicionales o factores que pueden modificar el efecto del gene principal en la determinación del sexo (Durand y Durand, 1990). El borjón, muestra un dioicismo perfecto: las flores femeninas maduras no tienen ningún componente masculino y las flores masculinas maduras no tienen evidencias de estructuras femeninas (Cuatrecasas, 1948). Estas diferenciaciones fenotípicas sexuales claras, combinadas con su perennidad natural y la gran importancia económica del cultivo hacen del borjón una especie de importancia para estudios de la determinación del sexo.

2.2.4 Identificación de marcadores moleculares ligados al sexo.

La aplicación de la biología molecular para la investigación agrícola y el mejoramiento es altamente reconocida como una poderosa herramienta para la mejor utilización de los recursos fitogenéticos, para la selección eficiente de

genotipos deseables, para agilizar el mejoramiento de cultivos y la introducción de genes mejorados de fuentes inaccesibles para la hibridación sexual convencional (Pérez de la Vega, 1996).

Las técnicas de manipulación y análisis de los ácidos nucleicos han experimentado importantes avances en los últimos años especialmente en la generación de marcadores moleculares de ADN de gran aplicación en el análisis del genoma de numerosas especies vegetales con diversos objetivos especialmente en frutales donde el periodo de juvenilidad y entrada en producción es largo.

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten diferenciar entre genotipos. Estos pueden ser genes o segmentos sin función conocida pero cuyo patrón de herencia puede ser seguido fácilmente usando procesos de laboratorio. Los marcadores moleculares han sido usados para mapeo de genes, cualitativo y cuantitativo (King, 1994.), fingerprinting (Vos et al, 1995), estudios de diversidad genética, flujo de genes, para localizar caracteres ligados al sexo (Hormaza et al, 1994^a Mandolino et al, 1999, Gill et al 1998, Spada et al, 1998), localización de genes de androesterilidad termo estable en arroz (Wang et al, 1995), selección asistida por marcadores de los genes de restauración de fertilidad masculina en trigo (Ma, 1995, Ma et al, 1995) y clonaje de genes. En papaya (*Carica papaya*), recientemente se describió la identificación de una sonda de microsatélites (GATA)₄, específica para los machos, la cual reveló diferencias de sexo en todos los cultivares analizados. El diagnóstico de estos marcadores microsatélites se usó para sexar plantas de papaya en las etapas tempranas de desarrollo (1-2 meses). Además sugirió que el material genético de los cromosomas X e Y es divergente en una manera específica para el sexo y se encuentra en un proceso de diferenciación (Parasnis AS et al, 1999)

2.2.5 Descripción de los marcadores moleculares RAPDs, RFLPs y AFLPs

Entre los marcadores ADN más utilizados en estudios en caracterización molecular de especies vegetales tenemos los "polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción" (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) los cuales se basan en el empleo de enzimas de restricción que son capaces de reconocer secuencias en el ADN y cortarlo en ese lugar. De esta forma, el ADN se ve reducido a una serie de fragmentos de un tamaño determinado, de forma que el número de fragmentos producidos y sus tamaño es una consecuencia de la distribución de las secuencias blanco reconocidas por la enzima de restricción a lo largo del genoma. Los fragmentos así producidos son específicos para cada combinación ADN/enzima de restricción y se pueden usar como una huella dactilar específica para cada ADN o para el organismo que contiene ese ADN, como una medida directa de la variabilidad genética. La separación de los fragmentos según su tamaño se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa o

poliacrilamida. Los RFLPs en especies vegetales se pueden estudiar en ADN de cloroplastos, de mitocondrias, o ADN genómico (Hormaza, 1996, Tanksley et al., 1989, Williams et al, 1990).

Con la llegada de nuevas estrategias surgidas a la luz de los recientes desarrollos en la tecnología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han aparecido nuevas variedades de marcadores. Entre estas técnicas, la más conocida es la del ADN polimorfo amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD). En este caso, se amplifican determinadas regiones del genoma mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) por acción de una enzima ADN polimerasa. Para realizar su función, la DNA polimerasa requiere un fragmento de ADN preexistente que actúe como iniciador y sobre el que se produce la síntesis del nuevo ADN (Williams et al, 1990, 1993).

De esta forma, diferentes iniciadores producen la amplificación de distintos fragmentos de ADN. Los polimorfismos entre individuos, utilizando el mismo cebador, pueden sugerir de diferentes formas. Una manera es mediante cambios en la secuencia de nucleótidos en el lugar de unión del cebador al ADN impidiendo la amplificación de un fragmento determinado. También pueden surgir mediante inserciones que hacen que los lugares de unión de los cebadores queden demasiado alejados para que pueda tener lugar la amplificación. Por último, inserciones o deleciones pueden cambiar el tamaño del segmento amplificado. Como resultado, pequeñas divergencias entre individuos resultan en diferentes patrones de amplificación (Pérez de la Vega, 1996, Williams et al, 1990, 1993).

Comparando las diferentes técnicas para obtener marcadores moleculares encontramos que el procedimiento de los RAPDs es relativamente sencillo ya que sólo incluye PCR y electroforesis de gel de agarosa. Así mismo, sus polimorfismos son usualmente visualizados sin necesidad de radioisótopos. La reproducibilidad de los marcadores RAPDs, sin embargo, depende del apareamiento de 9 a 10 b de secuencia arbitraria de los iniciadores. Los iniciadores tienen una alta composición de AT y se aparean a temperaturas bajas. Esto dificulta la obtención de resultados repetibles usando condiciones estándar de PCR de acuerdo al número de iniciadores probados. Así mismo, las diferencias en la concentración de Mg^{++} , la concentración de dNTPs, los parámetros de los ciclos, y otras condiciones afectan significativamente el rendimiento de la reacción de PCR, afectando la reproducibilidad de algunos análisis de RAPDs y la comparación de RAPDs entre laboratorios.

La detección de los marcadores RFLPs incluyen preparación y marcaje de las sondas de DNA, digestión de DNAs genómicos numerosos con enzimas de restricción, electroforesis de gel e hibridación de tipo Southern blot. Estos procesos son mucho más laboriosos que el análisis del DNA por medio de RAPD. Los RFLPs requieren de gran cantidad de DNA genómico (entre 5 a 10 μg por planta). Además, esta técnica requiere de un tiempo largo. Según algunos

reportes, el número de polimorfismos de RFLP identificados por prueba es bajo (Jhy-Jhu et al. 1996).

La técnica AFLP combina estrategias de los RAPDs y de RFLP. El DNA es digerido con endonucleasas de restricción (Eco RI y Mse I) que son particularmente estables. Eco RI tiene un sitio de reconocimiento de 6 bp, y Mse I tiene un sitio de reconocimiento de 4 bp. Al ser usadas juntas generan fragmentos de DNA pequeños que pueden amplificarse bien y en un rango de tamaño óptimo (menor de 1kb) para ser separadas sobre el gel de poliacrilamida denaturante, mientras que los pares de iniciadores y la estrategia de amplificación no favorecen la amplificación de los fragmentos generados por las combinaciones Eco RI - Eco RI y Mse I - Mse I. Sin embargo, esta técnica depende de una digestión de restricción completa, en la cual la concentración de DNA genómico utilizado debe ser alta (hasta 300ng/μl) y éste debe estar limpio de contaminantes como nucleasas o inhibidores. Luego de la inactivación de las endonucleasas, los fragmentos de DNA genómico son ligados a adaptadores específicos para generar el DNA molde para la amplificación. Las secuencias de los adaptadores flanquean la secuencia de DNA genómico variable sirviendo como sitio de ligamiento de los iniciadores. Esta estrategia hace posible la amplificación de muchos fragmentos de DNA sin requerir una secuencia previamente conocida.

Los fragmentos de DNA son entonces amplificados por dos reacciones consecutivas de PCR. Dependiendo de la complejidad del genoma se utilizan iniciadores relativos para reducir el número de fragmentos amplificados. La primera reacción es llamada preamplificación, en la cual los DNAs genómicos son amplificados con iniciadores de AFLP que contienen cada uno un nucleótido selectivo. Los productos de esta reacción son utilizados para la segunda reacción de amplificación selectiva, en la cual se usan dos iniciadores con 3 nucleótidos selectivos. Cabe anotar que el iniciador selectivo para el sitio Eco RI es marcado con ³²P antes de la amplificación. La estrategia de los dos pasos de amplificación hace que los moldes de fragmentos de DNA usando condiciones de PCR estándar sean altamente reproducibles. El factor más importante en la determinación del número de fragmentos de restricción amplificados en una sola reacción de AFLP es el número de nucleótidos selectivos en los iniciadores. Así mismo, la composición de C y G en los nucleótidos selectivos es también un factor determinante en el número de fragmentos amplificados. Típicamente se amplifican de 50 a 100 fragmentos de restricción los cuales son detectados por electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante. Así esta técnica provee una poderosa metodología de huellas digitales de DNA para DNAs de diferente origen o complejidad (Vos et al. 1995).

Un método para determinar el sexo de las planta dioicas del borojó en estado juvenil facilitaría la selección y diferenciación entre plantas femeninas y masculinas para el establecimiento de cultivos con características definidas. Actualmente no existen marcadores morfológicos que permitan identificar caracteres ligados al sexo antes de la edad de floración. Por lo tanto, los

marcadores moleculares basados en el análisis del ADN genómico son una buena opción.

En este estudio se propone el uso de los marcadores moleculares ADN de tipo AFLP para la determinación del sexo en las plantas dioicas de borojó teniendo en cuenta que:

- a) se basan en el alto número de marcadores ADN teóricamente posible ya que utilizan la abundante variación existente en la secuencia de ADN tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma.
- b) No son dependientes de la expresión de los genes.
- c) Son generalmente inocuos para el individuo analizado, ya que una pequeña cantidad de ADN es generalmente necesario para su caracterización (Perez de la Vega, 1997).
- d) El Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira ha utilizado los marcadores moleculares de tipo AFLP para caracterizar el banco de germoplasma de morera del Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS) del Departamento de Risaralda.

Los resultados del trabajo propuesto buscan aumentar la oferta de clones seleccionados, caracterizados y sanos de un frutal tropical promisorio propio de la biodiversidad colombiana, con miras a apoyar su explotación comercial sostenible en beneficio de la comunidad agrícola y agroindustrial del país.

2.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arenas E, Cuellar L, El Borojó. Cultivo promisorio para el trópico húmedo

Awise J.C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall Inc., New York.

Bawa K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. Annu. Rev.Ecol. Syst. 11: 15-39.

Cuatrecasas J, 1948. El Borojó, un nuevo genero de Rubiaceae. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Física Químicas y Naturales Vol VII. Nº 28.

Departamento Nacional de Planeación. 1992 Plan Pacífico: una nueva estrategia de desarrollo sostenible para la costa pacífica colombiana. Presidencia de la República – Departamento Nacional de Planeación, Bogotá Colombia.

Durand R, Durand B. 1990. Sexual determination and sexual differentiation. Crit. Rev. Plant Sci. 9:295-316.

Forero E, Gentry A. H. 1989. Lista anotada de plantas del departamento del

Chocó, Colombia. Instituto de Ciencias Naturales – Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Gentry, A.H. 1982 Phytogeography patterns as evidence for a Chocó refuge. P 112- 136 in G. T. Prance, ed., Biological diversifications in the tropic. Columbia University Press, New York, USA.

Gentry A H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. Ann.Missouri Botanical Garden 75:1-34

Gill G.P, Harvey R C, Gardner RC, Fraser L G. 1998. Development of sex-linked PCR marker for gender identification in Actinidina. Theor. Appl.Genet. 97: 439-445.

Hervieu F., Bannerot H.,Pelletier G., 1994. A unique cytoplasmic male sterility (CMS) determinant is presented in three Phaseolus species characterized by different mitochondrial genomes. Theor . App.Genet. 88, 314-320.

Hormaza J I. 1996 Marcadores de ADN aplicados a la Mejora de Frutales ITEA. Vol. 92V nº 1,5-15.

Informe, 1984. El borojó, Proyecto DIAR – CODECHOCÓ

Irish E E, Nelson T. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious Plants. Plant Cell 1:737-744

Mosquera J L, Arenas, E. 1995. El borojó, Cultivo Agroforestal del Chocó Fundamentos para el desarrollo sostenible. CODECHOCÓ.

King G.J., 1994. Progress in mapping agronomic genes in apple. Euphytica 77: 65-69

Lewis K R And John B. 1968. The chromosomal basis of sex determination. Int Rev Cytol. 23:277-379.

Ma Z Q, Sorrells M. E. 1995 Genetic Analysis of Fertility restoration in Wheat using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Crop. Sci.35, 1137 - 1143.

Ma Z Q, Zhao Y H, Sorrells M E. 1995 Inheritance and chromosomal locations of male fertility restoring gene transferred from Aegilops umbellulata, Zhur to Triticum aestivum L. Mol. Gen. Genet.. 247, 351 357.

Mandolino, G.; Carboni, A, Forapani, S, Faeti,V; Ranalli, P. 1999 Identification of an ADN Marker linked to the male sex in dioecious hemp (Cannabis sativa L).Theor. App. Genet. 98:86-92.

Vos et al., 1995. AFLPs: a New technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acid Res. Vol. 23 N° 21. 4407-4414

Parker J.S, Clark M.S. 1991. Dosage chromosome systems in plants. Plant Sci. 80:79-92.

Parasnis AS, Ramakrishna W, Chowdari KV, Gupta VS, Ranjekar PK., 1999 Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. Theor Appl Genet. 99:1047-1052

Revista, 1988. "Perspectiva del borojó" ASPRODETH.

Rafalski J A, Tingey S.V., 1993. Genetic Dignostics in plant breending: RAPD's micro satellites and machines. Trend. Genet. 9(8):275-280.

Spada. A, Caporali. E, Marziani. G., Portaluppi P. Restivo, F.M., Tassi, F., Falavigna. 1998. A genetic map of Asparagus officinalis based on integrate RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. 1998. Theor. Appl. Genet. 97: 1083-1089.

Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W., 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technology 7:257-264.

Wang B, Xu W, Wang J Z, Wu Z, Heng G, Yang Z, Ray I.D, Nguyent H T. 1995 Tagging and Mapping the thermo-sensitive male sterile gene in Rice (*Oryza sativa*) with molecular markers. Theor.Appl. Genet. 91, 1111-1114.

Westergaard M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Adv. Genet. 9:217-281

Williams J.G.K., Hanafey A.R., Livak K.J., Rafalsky J.A., Tingey S.V., 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Methods in Enzymology 218:704-740.

Williams J.G.K., Hanafey A.R., Livak K.J., Rafalsky J.A., Tingey S.V., 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 18(22): 6531-6536.

Yampolosky C, Yampolosky H. 1922.Distribution of sex forms in the phanerogamic Flora. Bibl. Genet 3: 1-62.

3. AREA DE APLICACIÓN

Ciencias agronómicas y biotecnología vegetal

4. TIPO DE ACTIVIDAD Y USOS QUE SE DARÁ AL RECURSO

Tipo de Actividad: Investigación

Los resultados del trabajo propuesto buscan aumentar la oferta de clones seleccionados, caracterizados y sanos de un frutal tropical promisorio propio de la biodiversidad colombiana, desarrollando una técnica molecular para la identificación temprana del sexo en las plantas de borojó, con miras a apoyar su explotación comercial sostenible en beneficio de la comunidad agrícola y agroindustrial del país.

5. LISTA DE REFERENCIA DE RECURSOS GENÉTICOS, PRODUCTOS DERIVADOS Y COMPONENTES INTANGIBLES ASOCIADOS, A LOS QUE SE PRETENDE ACCEDER (NOMBRE CIENTÍFICO, NOMBRE VULGAR Y NÚMERO DE MUESTRAS)

RECURSOS GENÉTICOS

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	NÚMERO DE MUESTRAS
<i>Borojoa patinoi</i> , Cuatrecasas	Borojó	5 hojas jóvenes de 50 plantas de ambos sexos

PRODUCTOS DERIVADOS

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	NÚMERO
PRIMERS O INICIADORES	Marcadores Moleculares	2

6. LOCALIZACION DE LAS AREAS DE ACCESO Y DE REALIZACION DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO (COORDENADAS)

- a) DE RECOLECCION
- b) UBICACION DEL AREA DE ACCESO

a) RECOLECCIÓN

- 1. Cultivo privado en condominio campestre La Virginia (Risaralda)

2. Cultivo experimental en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira

b) UBICACIÓN DEL AREA DE ACCESO

La virginia:

Coordenadas: Latitud: 04°53'43'' N Longitud: 75° 52'42'' O

In Situ: X ExSitu:

Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira

Coordenadas: Latitud: 4.81° o 4°48.8' Longitud: -75.7° o -75°-41.77'

c) LUGAR DE PROCESAMIENTO Y/O USO DEL MATERIAL GENETICO, LOCALIZACIÓN

Universidad Tecnológica de Pereira, Centro de Biología Molecular y Biotecnología (CENBIOTEP), Edificio de la Facultad Ciencias de la Salud, primer piso. Pereira, Risaralda.

Coordenadas: Latitud: 4.81° o 4°48.8' Longitud: -75.7° o -75°-41.77'

7. CRONOGRAMA INDICATIVO

ACTIVIDADES	TIEMPO	LUGAR	METODOLOGIA
Selección de las plantas	1mes	Cultivo privado en Condominio Campestre en la Virginia (Risaralda) y Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Perelra	Se escogerán 5 hojas jóvenes de 10 árboles adultos fructificadas (hembras) y no fructificadas (machos que se marcarán con un código asignado de acuerdo al sexo en el cultivo privado de la Virginia (Risaralda) y 40 plantas jóvenes del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Se analizarán 50 plantas

Manejo	1 meses	Centro de Biología Molecular y Biotecnología (CENBIOTEP)	Las 5 hojas de cada una de las 50 plantas se macerarán en nitrógeno líquido y el polvo producto de esta maceración se guardarán en tubos cónicos de 50 ml a -80°C
Investigación	10 meses	Centro de Biología Molecular y Biotecnología	Del material macerado se tomará 1 gramo para la extracción del ADN y para la experimentación con técnicas moleculares. Primero se estandarizará las mejores combinaciones de iniciadores del estuche de AFLPs con los cuales resulte mayor número de información. Una vez identificadas estas combinaciones se realizarán los AFLPs para cada una de las 40 plantas y luego se evaluará la presencia de bandas y su relación con el sexo. Las bandas identificadas serán secuenciarlas y con la información de esta secuencia se construirán en el laboratorio dos primers o iniciadores para desarrollar un método basado en la PCR para la identificación temprana del sexo en borojó. Estandarizado este método se aplicará al ADN obtenido de las 50 plantas por

			un experimentador que desconoce la codificación para probar sensibilidad y especificidad.
--	--	--	---

Duración aproximada: 12 meses

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Selección de las plantas

Se seleccionarán plantas hembras y machos en periodo de fructificación que permitan identificar claramente el sexo. Se trabajarán muestras de árboles de un cultivo privado en la Virginia (Risaralda) y de un cultivo experimental que se estableció desde el año 2002 a partir de semillas obtenidas de frutos comprados en un supermercado local las cuales fueron preliminarmente germinadas *in vitro* utilizando como soporte vermiculita y posteriormente endurecidas en suelo estéril y luego transferidas a campo en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Se analizarán 50 plantas

8.2 Extracción de ADN

Se tomarán hojas tiernas del material del campo y se refrigerarán a -80°C hasta la extracción del ADN. Para la extracción del material genético se utilizará el estuche comercial Puregene de la casa comercial Gentra, (Minneapolis, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante descritas para el manejo de material vegetal. Se utilizaran 3 gr. de hojas tiernas por duplicado para cada árbol. El ADN extraído será resuspendido en 300 ul de Tris-EDTA (pH 8.0) y luego se cuantificara por absorción UV en un espectrofotometro Shimadzu (UV-1601).

8.3 Reacción de AFLPs

La reacción para los AFLPs se llevará a cabo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial GIBCO usando el estuche comercial "Analysis System I" para AFLPs. Se ensayarán diferentes combinaciones de cebadores para seleccionar las que den un mayor número de bandas polimórficas. Los resultados se examinaran en geles de secuencia de poliacrilamida al 6% y úrea 8M y se teñirán con plata usando el estuche comercial "Silver Sequence DNA Staining System" de la casa comercial Promega siguiendo las especificaciones del fabricante.

8.4 Análisis de datos

Los geles serán analizados en un transiluminador de luz blanca para determinar la presencia o ausencia de la banda particular. Se construirán matrices de datos

binarios manualmente, indicando con 1 la presencia y 0 la ausencia de una banda en particular. Los datos obtenidos se analizarán estadísticamente usando el paquete NTSYS 2.0. Se buscarán aquellas bandas completamente ligadas a cada uno de los sexos para buscar relaciones genéticas entre individuos y aprovechar los datos que se están obteniendo para utilizar el índice de similaridad de Nei y Li (1979).

8.5 PCR

Los bandas particulares que identificarán el sexo en la planta dioica del borojó, serán aisladas y secuenciadas. Una vez obtenida su secuencia se diseñarán los primers o iniciadores siguiendo el programa GENE Runner versión 3.0 y luego se sintetizarán en un oligosintetizador de nucleótidos que permitirá estandarizar una PCR para identificación temprana del sexo en plantas de borojó.

9. MANEJO DE LA MUESTRA

Cada muestra de hojas jóvenes de cada planta será codificada por planta y sexo y almacenada a -80°C en el Centro de Biología Molecular y Biotecnología. Luego se procederá a la maceración de estas hojas con nitrógeno líquido y el polvo obtenido se guardará en tubos cónicos de 50 ml, debidamente etiquetados de acuerdo con el código de las plantas. Luego se procederá a tomar 1 gramo de este material para realizar la extracción del ADN para realizar la experimentación molecular. El material sobrante se almacenará en los congeladores a -80°C que se encuentran ubicados en CENBIOTEP.

10. EVENTUALES RESULTADOS ESPERADOS

De acuerdo con lo expresado en el proyecto la metodología de marcadores moleculares ha sido utilizada ya en papaya, para buscar marcadores ligados al sexo (Parasnis et al. 1999). El trabajo de Parasnis, basado en microsatélites, nos da una cierta seguridad de que este tipo de tecnología es aplicable al problema planteado. La posibilidad de determinar el sexo es más apremiante en borojó que en papaya ya que la frutificación en borojó requiere varios años.

Como se puede apreciar en el estudio de papaya mencionado, la correlación entre los marcadores seleccionados y el sexo deber ser del 100% para poder utilizarla de la manera propuesta.

10.1 Resultados Directos:

- a) Obtención de marcadores moleculares ligados a la determinación del

sexo en borjón.

- a) Selección de plantas de borjón sexualmente definidas que permitan el establecimiento de cultivos comerciales sostenibles..

10.2 Resultados indirectos – impactos

- a) Publicaciones nacionales e internacionales.
- b) Formación y capacitación de recurso humano en el tema.
- c) Apoyo a labores asociativas entre cultivadores de borjón, viveros productores de plantas y técnicos agrónomos.
- d) Fortalecimiento institucional para el desarrollo de la fruticultura mediante la utilización de recursos biológicos promisorios con la contribución de las técnicas de la biología molecular.
- e) Conservación de cultivos tradicionales de la región.
- f) Promoción de recursos fitogenéticos infra-utilizados
- g) Colaboración entre las instituciones que trabajan en biodiversidad.

10.3 Contribución estratégica al eje temático de Interés Regional

Aplicación de las nuevas biotecnologías al estudio de especies de plantas promisorias infrautilizadas que permita su promoción, utilización y comercialización.

11. PRESUPUESTO INICIAL

Tabla 1. PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO (en miles de pesos)

Rubros	UTP	TOTAL
PERSONAL	43.161	43.161
EQUIPO	6.500	6.500
MATERIALES E INSUMOS	11.500	11.500
SALIDAS DE CAMPO	0	0
VIAJES	1.700	1.700
BIBLIOGRAFIA	500	500
SOFTWARE	0	0
PUBLICACIONES	500	500
SERVICIOS TECNICOS	0	0
CONSTRUCCIONES	1.500	1.500
MANTENIMIENTO DE EQUIPOS	1.500	1.500
ADMINISTRACIÓN	0	0
TOTAL	66.861	66.861

Tabla 2. DESCRIPCIÓN DE LOS GASTOS DE PERSONAL (en miles de pesos)

INVESTIGADOR (NOMBRE)	FUNCIÓN DENTRO DEL PROYECTO	DEDICACIÓN		UTP	TOTAL
		Horas semana	Total Horas al proyecto		
Alvaro H. Alegria	Investigador principal	10	430	6.926	6.926
Lucero Rengifo R	Coinvestigador	10	430	10.713	10.713
Enrique Agullar F	Coinvestigador	10	430	10.012	10.012
Duverney Gaviria	Coinvestigador	5	430	7.755	7.755
Clara Inés Giraldo	Coinvestigador	10	430	7.755	7.755
TOTAL					43.161

Tabla 3. DESCRIPCION DE LOS EQUIPOS QUE PLANEA ADQUIRIR (en miles de pesos)

EQUIPO	JUSTIFICACION	UTP	TOTAL
Cámara de electroforesis submarina	Separación de fragmentos de ADN de los productos de PCR.		
Fuente de poder de 3.500 V	Aplicar diferentes voltajes para separar los fragmentos de los productos de PCR	3.000	3.000
Equipo fotográfico	Registro permanente de los resultados obtenidos en los geles de secuencia	3.000	3.000
Paquete de peines y separador para secuenciamiento	Para formar los geles de secuenciamiento de diferentes espesores.	500	500
TOTAL		6.500	6.500

Tabla 3ª. DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS DE USO PROPIO (en miles de pesos)

EQUIPO	CONTRAPARTIDA
Centrífuga Refrigerada	11.000
Termociclador 9.600	12.000
Termociclador 2400	9.000
Agitador	16.000
Congelador a -70°C	9.000
Congelador a -30°C	4.000
Cabina de seguridad II	13.000
Microcentrífuga refrigerada	10.000
Centrífuga refrigerada	8.000
Equipo de electroforesis	2.000
Lector de geles	11.000
Computador y accesorios	6.000
Destilador de agua	16.000
Secuenciador manual	7.000
Transiluminador	6.000
Cámara polaroid	2.000
Autoclave	10.000
Baños de Agua	7.000
Balanza analítica	6.000
Espectrofotómetro	22.000
Pantallas de radioactividad	5.000

TOTAL	192.000
-------	---------

Tabla 4. DESCRIPCION Y JUSTIFICACIÓN DE LOS VIAJES (en miles de pesos)

LUGAR	JUSTIFICACION	PASAJES	ESTADIA	DIAS	UTP	TOTAL
Medellin	Presentación de resultados. Congreso Ciencias Biológicas	500	1200	5	1.700	1.700
TOTAL		500	1.200	5	1.700	1.700

Tabla 5. DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES Y SUMINISTROS (en miles de pesos)

MATERIALES	JUSTIFICACION	UTP	TOTAL
Material plástico desechable (tubos cónicos, pipetas, microtubos, puntas de micropipetas y filtros)	Aislamiento y procesamiento de las muestras	2.500	2.500
Reactivos	Análisis de las muestras y obtención de los resultados	7.000	7.000
Material radiactivo	Marcaje de sondas y productos de secuenciación	1.000	1.000
Material fotográfico	Registro de los resultados	500	500
Tinta y papel para impresora	Registro de los resultados y publicación de estos	500	500
TOTAL		11.500	11.500



Universidad
Tecnológica
de Pereira

SISTEMA NACIONAL AMBIENTAL
UMA

FORMATO No. 1:

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN DIVERSIDAD BIOLÓGICA

AUTORIDAD AMBIENTAL COMPETENTE:

NO. DE REPLICACIÓN

[illegible]

Acreditado Institucionalmente de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.
 NIT 891 430 0150 Apartado Aéreo 102 - Tel. Conmutador (57) (6) 311 7300 - Fax: 311 7300
www.dpedu.edu.co - Pereira (Risaralda) - Colombia

2.2.4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.	La tesis plantea el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. El objeto de la tesis es el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. Los objetivos de la tesis son: 1. Describir el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. 2. Analizar el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. 3. Evaluar el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. La metodología de la tesis es: 1. Investigación documental. 2. Investigación de campo. 3. Investigación de laboratorio. La estructura de la tesis es: 1. Introducción. 2. Marco teórico. 3. Metodología. 4. Resultados. 5. Conclusiones.
2.2.5. OBJETIVO GENERAL.	Analizar el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud.
2.2.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	1. Describir el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. 2. Analizar el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. 3. Evaluar el rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud.
2.2.7. JUSTIFICACIÓN GENERAL.	La investigación es importante porque contribuye al conocimiento del rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. La investigación es importante porque contribuye al conocimiento del rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud. La investigación es importante porque contribuye al conocimiento del rol del Estado, en materia de salud, en el desarrollo de la atención médica y la promoción de la salud, en el contexto de la reforma de la atención médica y la promoción de la salud.

1. EQUIPO DE CAMPO	EQUIPO DE CAMPO: Termómetro aneroide EQUIPO DE LABORATORIO PRÓPIA Cuestia Regional Termómetro 0-100 Termómetro 0-200 Agitador Centrifuga - 1000 Centrifuga - 3000 Cálculo de temperatura Microscopio compuesto Centrifuga refrigerada Balanza de laboratorio Lector de gases Centrifuga y microscopio Centrifuga de agua Secador de material Centrifuga Cámara oscura Actuación Medida de Agua Balanza analítica Espectrofotómetro Perforador de muestras
2. MATERIALES	UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
3. MATERIALES DE LABORATORIO	1. MATERIALES
4. MATERIALES DE LABORATORIO	1. MATERIALES 2. MATERIALES 3. MATERIALES 4. MATERIALES 5. MATERIALES 6. MATERIALES 7. MATERIALES 8. MATERIALES 9. MATERIALES 10. MATERIALES 11. MATERIALES 12. MATERIALES 13. MATERIALES 14. MATERIALES 15. MATERIALES 16. MATERIALES 17. MATERIALES 18. MATERIALES 19. MATERIALES 20. MATERIALES 21. MATERIALES 22. MATERIALES 23. MATERIALES 24. MATERIALES 25. MATERIALES 26. MATERIALES 27. MATERIALES 28. MATERIALES 29. MATERIALES 30. MATERIALES 31. MATERIALES 32. MATERIALES 33. MATERIALES 34. MATERIALES 35. MATERIALES 36. MATERIALES 37. MATERIALES 38. MATERIALES 39. MATERIALES 40. MATERIALES 41. MATERIALES 42. MATERIALES 43. MATERIALES 44. MATERIALES 45. MATERIALES 46. MATERIALES 47. MATERIALES 48. MATERIALES 49. MATERIALES 50. MATERIALES 51. MATERIALES 52. MATERIALES 53. MATERIALES 54. MATERIALES 55. MATERIALES 56. MATERIALES 57. MATERIALES 58. MATERIALES 59. MATERIALES 60. MATERIALES 61. MATERIALES 62. MATERIALES 63. MATERIALES 64. MATERIALES 65. MATERIALES 66. MATERIALES 67. MATERIALES 68. MATERIALES 69. MATERIALES 70. MATERIALES 71. MATERIALES 72. MATERIALES 73. MATERIALES 74. MATERIALES 75. MATERIALES 76. MATERIALES 77. MATERIALES 78. MATERIALES 79. MATERIALES 80. MATERIALES 81. MATERIALES 82. MATERIALES 83. MATERIALES 84. MATERIALES 85. MATERIALES 86. MATERIALES 87. MATERIALES 88. MATERIALES 89. MATERIALES 90. MATERIALES 91. MATERIALES 92. MATERIALES 93. MATERIALES 94. MATERIALES 95. MATERIALES 96. MATERIALES 97. MATERIALES 98. MATERIALES 99. MATERIALES 100. MATERIALES

ALL INFORMATION CONTAINED HEREIN IS UNCLASSIFIED
DATE 08-19-2007 BY 60322 UCBAW

34 258 109

Ante el hecho de que la mayoría de los países latinoamericanos han experimentado un crecimiento económico sostenido y una reducción de la pobreza, se ha planteado la posibilidad de que estos países puedan ser considerados como "países en desarrollo". Sin embargo, es importante tener en cuenta que la definición de "país en desarrollo" no es absoluta y puede variar según el contexto y los criterios utilizados.

COPIA



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

Bogotá D.C. 08 de abril de 2011

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL
DIRECCIÓN DE ECOSISTEMAS
ACONSEJORIA CITA: 1120-121-48418
TIPO DOCUMENTAL: SOLICITUD
PERMITO TMTAMAYO
DESTINATARIO: DIRECCIÓN DE ECOSISTEMAS

Doctora
CLAUDIA RODRIGUEZ
Ministerio De Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial
Dirección de Ecosistemas
Grupo de Gestión de Biodiversidad

REF: CONSULTA SOBRE CONTRATO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS.

Cordial saludo,

De la manera más respetuosa me dirijo a usted para pedirle se sirva conceptuar si se necesita o no el CONTRATO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS para una investigación sobre la "**determinación del sexo del Borojo (Borojoa Patinoi Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares**", planta cuyas semillas de Borojo fueron compradas en el "Supermercado La 14" de Pereira (Risaralda), sembradas luego en un vivero de la Universidad Tecnológica de Pereira UTP y en una finca del municipio de La Virginia (Risaralda) de cuyos cultivos se toman muestras de las hojas.

Le agradezco que envíe, por favor, su respuesta a mi nombre a la Cra. 13 A No. 28-38, Manzana 2 Oficina: 230, Parque Central Bavaria, Bogotá D.C.

Atentamente,


CARLOS ORLANDO MAYA R.
C.C. No. 17.117.818 de Bogotá
T.P. No. 17.402 del C.S. J.



COLOMBIA:
Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:
COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com