

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

COLOMBIA
REPUBLICA DE COLOMBIA
FECHA: 09 DE JUNIO DE 2005
LUGAR: PEREIRA, RISARALDA
DEPARTAMENTO: RISARALDA
MUNICIPIO: PEREIRA

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

1. SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

2.

SOLICITANTE
(71)

Nombre: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE
PEREIRA

Dirección: LA JULITA

Nacionalidad o Domicilio: PEREIRA, RISARALDA

Lugar de Constitución: PEREIRA, RISARALDA

Teléfono

Fax

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☒

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número: 891480035-9

3.

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA
RODRIGUEZ

Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2
Bufete 245. Parque Central Bavaria

Teléfono 3419841 Fax 3368592

E-mail: tmcarlos@etb.net.co

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número: 17,117,818 TP: 17,402

4.

(72)

Nombres: LUIS GONZAGA GUTIERREZ LOPEZ

Dirección: VEREDA LA JULITA

Nacionalidad o Domicilio: PEREIRA (RISARALDA), COLOMBIA

5. Título (54)

METODO PARA LA DETECCIÓN DE LA ESTABILIDAD GENETICA DE EMBRIONES
SOMATICOS DE ALISO ANDINO

6.

Clasificación Internacional (51) A01H 1/04; A01H 5/10; C12N 15/66

7. Prioridad

Si ☐ No ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8. Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐

12 meses ☐

☒

Otro ☐

Cual _____

9.

Comprobante de pago No. 04- 41840

Fecha JUNIO 09 DE 2005

2

10. Anexos

- ☒ 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.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de la fecha de presentación de la solicitud 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 del 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
- ☐ 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.

11. REPRODUCCION DEL SIGNO A DEPOSITAR

1
↓
2
↓
3
↓
4
↓
5
↓
6
↓
7
↓
8
↓
9

12.

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

3
4

[illegible]

Figure 1. The effect of the concentration of the *Agaricus bisporus* spores on the growth of *Agaricus bisporus* on the substrate. The concentration of the spores was 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, 10¹², 10¹³, 10¹⁴, 10¹⁵, 10¹⁶, 10¹⁷, 10¹⁸, 10¹⁹, 10²⁰, 10²¹, 10²², 10²³, 10²⁴, 10²⁵, 10²⁶, 10²⁷, 10²⁸, 10²⁹, 10³⁰, 10³¹, 10³², 10³³, 10³⁴, 10³⁵, 10³⁶, 10³⁷, 10³⁸, 10³⁹, 10⁴⁰, 10⁴¹, 10⁴², 10⁴³, 10⁴⁴, 10⁴⁵, 10⁴⁶, 10⁴⁷, 10⁴⁸, 10⁴⁹, 10⁵⁰, 10⁵¹, 10⁵², 10⁵³, 10⁵⁴, 10⁵⁵, 10⁵⁶, 10⁵⁷, 10⁵⁸, 10⁵⁹, 10⁶⁰, 10⁶¹, 10⁶², 10⁶³, 10⁶⁴, 10⁶⁵, 10⁶⁶, 10⁶⁷, 10⁶⁸, 10⁶⁹, 10⁷⁰, 10⁷¹, 10⁷², 10⁷³, 10⁷⁴, 10⁷⁵, 10⁷⁶, 10⁷⁷, 10⁷⁸, 10⁷⁹, 10⁸⁰, 10⁸¹, 10⁸², 10⁸³, 10⁸⁴, 10⁸⁵, 10⁸⁶, 10⁸⁷, 10⁸⁸, 10⁸⁹, 10⁹⁰, 10⁹¹, 10⁹², 10⁹³, 10⁹⁴, 10⁹⁵, 10⁹⁶, 10⁹⁷, 10⁹⁸, 10⁹⁹, 10¹⁰⁰, 10¹⁰¹, 10¹⁰², 10¹⁰³, 10¹⁰⁴, 10¹⁰⁵, 10¹⁰⁶, 10¹⁰⁷, 10¹⁰⁸, 10¹⁰⁹, 10¹¹⁰, 10¹¹¹, 10¹¹², 10¹¹³, 10¹¹⁴, 10¹¹⁵, 10¹¹⁶, 10¹¹⁷, 10¹¹⁸, 10¹¹⁹, 10¹²⁰, 10¹²¹, 10¹²², 10¹²³, 10¹²⁴, 10¹²⁵, 10¹²⁶, 10¹²⁷, 10¹²⁸, 10¹²⁹, 10¹³⁰, 10¹³¹, 10¹³², 10¹³³, 10¹³⁴, 10¹³⁵, 10¹³⁶, 10¹³⁷, 10¹³⁸, 10¹³⁹, 10¹⁴⁰, 10¹⁴¹, 10¹⁴², 10¹⁴³, 10¹⁴⁴, 10¹⁴⁵, 10¹⁴⁶, 10¹⁴⁷, 10¹⁴⁸, 10¹⁴⁹, 10¹⁵⁰, 10¹⁵¹, 10¹⁵², 10¹⁵³, 10¹⁵⁴, 10¹⁵⁵, 10¹⁵⁶, 10¹⁵⁷, 10¹⁵⁸, 10¹⁵⁹, 10¹⁶⁰, 10¹⁶¹, 10¹⁶², 10¹⁶³, 10¹⁶⁴, 10¹⁶⁵, 10¹⁶⁶, 10¹⁶⁷, 10¹⁶⁸, 10¹⁶⁹, 10¹⁷⁰, 10¹⁷¹, 10¹⁷², 10¹⁷³, 10¹⁷⁴, 10¹⁷⁵, 10¹⁷⁶, 10¹⁷⁷, 10¹⁷⁸, 10¹⁷⁹, 10¹⁸⁰, 10¹⁸¹, 10¹⁸², 10¹⁸³, 10¹⁸⁴, 10¹⁸⁵, 10¹⁸⁶, 10¹⁸⁷, 10¹⁸⁸, 10¹⁸⁹, 10¹⁹⁰, 10¹⁹¹, 10¹⁹², 10¹⁹³, 10¹⁹⁴, 10¹⁹⁵, 10¹⁹⁶, 10¹⁹⁷, 10¹⁹⁸, 10¹⁹⁹, 10²⁰⁰, 10²⁰¹, 10²⁰², 10²⁰³, 10²⁰⁴, 10²⁰⁵, 10²⁰⁶, 10²⁰⁷, 10²⁰⁸, 10²⁰⁹, 10²¹⁰, 10²¹¹, 10²¹², 10²¹³, 10²¹⁴, 10²¹⁵, 10²¹⁶, 10²¹⁷, 10²¹⁸, 10²¹⁹, 10²²⁰, 10²²¹, 10²²², 10²²³, 10²²⁴, 10²²⁵, 10²²⁶, 10²²⁷, 10²²⁸, 10²²⁹, 10²³⁰, 10²³¹, 10²³², 10²³³, 10²³⁴, 10²³⁵, 10²³⁶, 10²³⁷, 10²³⁸, 10²³⁹, 10²⁴⁰, 10²⁴¹, 10²⁴², 10²⁴³, 10²⁴⁴, 10²⁴⁵, 10²⁴⁶, 10²⁴⁷, 10²⁴⁸, 10²⁴⁹, 10²⁵⁰, 10²⁵¹, 10²⁵², 10²⁵³, 10²⁵⁴, 10²⁵⁵, 10²⁵⁶, 10²⁵⁷, 10²⁵⁸, 10²⁵⁹, 10²⁶⁰, 10²⁶¹, 10²⁶², 10²⁶³, 10²⁶⁴, 10²⁶⁵, 10²⁶⁶, 10²⁶⁷, 10²⁶⁸, 10²⁶⁹, 10²⁷⁰, 10²⁷¹, 10²⁷², 10²⁷³, 10²⁷⁴, 10²⁷⁵, 10²⁷⁶, 10²⁷⁷, 10²⁷⁸, 10²⁷⁹, 10²⁸⁰, 10²⁸¹, 10²⁸², 10²⁸³, 10²⁸⁴, 10²⁸⁵, 10²⁸⁶, 10²⁸⁷, 10²⁸⁸, 10²⁸⁹, 10²⁹⁰, 10²⁹¹, 10²⁹², 10²⁹³, 10²⁹⁴, 10²⁹⁵, 10²⁹⁶, 10²⁹⁷, 10²⁹⁸, 10²⁹⁹, 10³⁰⁰, 10³⁰¹, 10³⁰², 10³⁰³, 10³⁰⁴, 10³⁰⁵, 10³⁰⁶, 10³⁰⁷, 10³⁰⁸, 10³⁰⁹, 10³¹⁰, 10³¹¹, 10³¹², 10³¹³, 10³¹⁴, 10³¹⁵, 10³¹⁶, 10³¹⁷, 10³¹⁸, 10³¹⁹, 10³²⁰, 10³²¹, 10³²², 10³²³, 10³²⁴, 10³²⁵, 10³²⁶, 10³²⁷, 10³²⁸, 10³²⁹, 10³³⁰, 10³³¹, 10³³², 10³³³, 10³³⁴, 10³³⁵, 10³³⁶, 10³³⁷, 10³³⁸, 10³³⁹, 10³⁴⁰, 10³⁴¹, 10³⁴², 10³⁴³, 10³⁴⁴, 10³⁴⁵, 10³⁴⁶, 10³⁴⁷, 10³⁴⁸, 10<

[illegible][illegible][illegible]

Figure 1. The effect of the number of nodes on the number of iterations required to reach the optimal solution for the 1000 nodes problem. The number of iterations required to reach the optimal solution increases as the number of nodes increases. The number of iterations required to reach the optimal solution for the 1000 nodes problem is approximately 1000.



Libertad y Orden

Ministerio de Educación Nacional
Viceministerio de Educación Superior
República de Colombia

**LA SUBDIRECCIÓN DE LA VIGILANCIA ADMINISTRATIVA
DE LA EDUCACIÓN SUPERIOR DEL MINISTERIO DE EDUCACIÓN NACIONAL
EN CUMPLIMIENTO DE LAS FUNCIONES ATRIBUIDAS
EN LOS DECRETOS 2230, 2232 Y RESOLUCIÓN 3449 DE 2003**

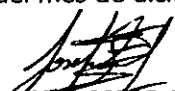
HACE CONSTAR

Que el/(la) Institución de Educación Superior **UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA** (código: 1111), con domicilio en PEREIRA, es una institución OFICIAL de educación superior, reconocida mediante LEY 41 de Diciembre 15 de 1958 expedido por el/la CONGRESO DE COLOMBIA

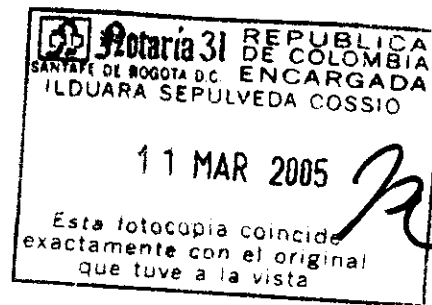
Que al folio 139 distinguido con el registro 139 del libro de rectores y representantes legales de las instituciones de educación superior aparece inscrito(a) el/(la) Doctor **LUIS ENRIQUE ARANGO JIMÉNEZ** identificado(a) con cédula de ciudadanía No 10.059.486 expedida en Pereira como **RECTOR** por un período de 3 año(s) a partir del 1 de enero de 2003, que dicha inscripción se efectuó el 17 de junio de 2003 de conformidad con lo dispuesto en RESOLUCIÓN No 03 del 18 de octubre de 2002 expedida por el/(la) CONSEJO SUPERIOR

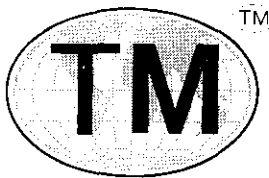
Que al folio 139 distinguido con el registro 139 del libro de rectores y representantes legales de las instituciones de educación superior aparece inscrito(a) el/(la) Doctor **LUIS ENRIQUE ARANGO JIMÉNEZ** identificado(a) con cédula de ciudadanía No 10.059.486 expedida en Pereira como **REPRESENTANTE LEGAL** por un período de 3 año(s) a partir del 1 de enero de 2003, que dicha inscripción se efectuó el 17 de junio de 2003 de conformidad con lo dispuesto en RESOLUCIÓN No 03 del 18 de octubre de 2002 expedida por el/(la) CONSEJO SUPERIOR

Se expide la presente constancia en Bogotá D.C., por solicitud de **CARLOS ENRIQUE TAMAYO**, a los 17 días del mes de diciembre de 2004


JOSE LUIS FRANCO LAVERDE
Subdirector de Vigilancia Administrativa(E)

Marina V.





TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

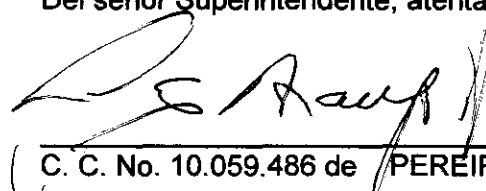
Trademark	Marcas
Patent	Patentes
Health Permit	Registros Sanitarios
Software	Soporte Lógico
Commercial Name	Nombres Comerciales
Design	Diseños

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

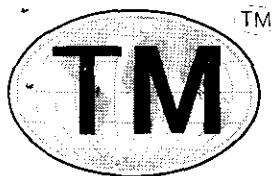
LUIS ENRIQUE ARANGO JIMENEZ, mayor de edad, domiciliado en **PEREIRA** identificado con la Cédula de Ciudadanía **10.059.486** expedida en **PEREIRA**, actuando como representante legal de la **UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**, como consta en el documento adjunto, por medio del presente confiero poder Especial pero amplio y suficiente a los abogados **CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ** y/o **GUSTAVO CALDERON ROSERO** y/o **CLARA TERESA CORTES DE RODRÍGUEZ**, y/o **CARMEN GRACIELA FLOREZ** y/o **ALBA NURY GUTIERREZ** y/o **BLANCA LUCILA TAMAYO** en su orden, identificados con las Cédulas de Ciudadanía No. 17.117.818 de Bogotá, 17.119.352 de Bogotá, 22.429.053 de Barranquilla, 63.325.304 de Bucaramanga, 43.521.055 de Medellín, 46.666.992 de Duitama y portadores de las Tarjetas Profesionales Nos: 17.402, 14.557, 31.984, 97.983, 95.722, 95.719 del Consejo Superior de la Judicatura, respectivamente, domiciliados en la Carrera 13 A No. 28-38 Mz. 2 Buffette 245, Parque Central Bavaria de Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes a **SOLICITUD DE REGISTRO PATENTE DE INVENCION: "METODO PARA LA DETECCION DE LA ESTABILIDAD GENETICA DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALISO ANDINO."**

En consecuencia, mis apoderados quedan facultados para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado, como son: Elevar solicitudes, cesiones, modificaciones, descripciones, protestas, declaraciones, reposiciones y apelaciones, presentar observaciones, oposiciones, reclamos, responder observaciones y/o oposiciones, Solicitar Renovaciones, abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley; Recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualesquiera solicitudes, que a juicio de los apoderados pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar el derecho marcario del Mandante. Al Mandatario se le otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo así mismo sustituir este poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones, así como también cualquier otra diligencia relacionada con este proceso.

Del señor Superintendente, atentamente,


C. C. No. 10.059.486 de PEREIRA

Carrera 13 A No. 28-38 Mz 2 Bufette 245 Parque Central Bavaria
PBX (57 1) 341 9841 - FAX (57 1) 336 8592 - Cel. (315) 317 1181
E-mails: tmcarios@etb.net.co , trademarks1@hotmail.com
Bogotá D.C., COLOMBIA, S.A.



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark	Marcas
Patent	Patentes
Health Permit	Registros Sanitarios
Software	Soporte Lógico
Commercial Name	Nombres Comerciales
Design	Diseños

CONTRATO CESION DE PATENTE

Entre los suscritos a saber LUIS GONZAGA GUTIERREZ LOPEZ domiciliado en PEREIRA con cédulas de ciudadanía No. 10.110.932 de Pereira, mayor de edad, quien en adelante se denominara **INVENTOR O CEDENTE** y por la otra parte LUIS ENRIQUE ARANGO JIMENEZ, mayor de edad, vecino de PEREIRA, identificado con la cédula de ciudadanía No. 10.059.486 de PEREIRA quien actúa en nombre y representación de la UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA, quien para los efectos de este contrato se denominará **EL CESIONARIO**, se ha acordado suscribir el presente contrato de Cesión de Patrimonial y demás normas generales sobre la materia y en especial por las siguientes cláusulas:

PRIMERA- OBJETO: EL INVENTOR manifiestan que de manera voluntaria y gratuita, realizaran la Cesión a favor de EL CESIONARIO, de todos los derechos patrimoniales que a ellos les corresponden como creadores de la Invención denominada: **"METODO PARA LA DETECCION DE LA ESTABILIDAD GENETICA DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALISO ANDINO"**

ALCANCE DEL OBJETO: Los derechos aquí cedidos comprenden todos los derechos patrimoniales (Reproducción, transformación, comunicación publica y distribución) y se dan sin limitación alguna en cuanto a territorio se refiere; esta Cesión se da por todo el término de duración establecido en la legislación vigente en Colombia.

TERCERA DERECHOS MORALES: La cesión de los derechos antes mencionados no implica la cesión de los derechos morales sobre la misma porque de conformidad con lo establecido en el artículo 22 de la Decisión 486/2000 de la Comunidad Andina de Naciones estos derechos son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

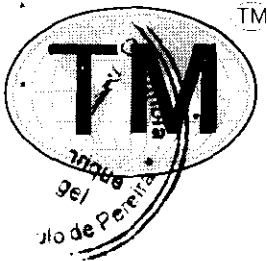
CUARTA: EL INVENTOR O CEDENTE manifiestan que la obra objeto del presente contrato es original y fue realizada por él sin violar o usurpar derechos de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y detenta la titularidad de la misma, la cual cede en virtud del presente contrato.

PARAGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL INVENTOR O CEDENTE asumirán toda la responsabilidad, y saldrán en defensa de los derechos aquí cedidos; para todos los efectos EL CESIONARIO actúa como un tercero de buena fe.

QUINTA EXCLUSIVIDAD: LOS INVENTORES O CEDENTES manifiestan que los derechos sobre la obra en cuestión no han sido cedidos con

Carrera 13 A No. 28-38 Mz 2 Bufette 245 Parque Central Bavaria
PBX (57 1) 341 9841 - FAX (57 1) 336 8592 - Cel. (315) 317 1181
E-mails: tmcargos@etb.net.co, trademarks1@hotmail.com
Bogotá D.C., COLOMBIA, S.A.

49



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark	Marcas
Patent	Patentes
Health Permit	Registros Sanitarios
Software	Soporte Lógico
Commercial Name	Nombres Comerciales
Design	Diseños

antelación y que sobre ellos no pesa ningún gravamen ni limitación en su uso o utilización.

Para constancia se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor, en Pereira a los _____ () del mes de _____ () del año dos mil cinco (2005).

Firmas:

AUTOR:

Luis G. Gutiérrez

LUIS GONZAGA GUTIERREZ LOPEZ
C.C. No. 10.110.932 de Pereira

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO Ante el Suscrito Notario Sexto del Circulo de Pereira comparecieron: <u>Luis Gonzaga Gutierrez Lopez</u> <u>[Signature]</u> Identificados respectivamente con las C.C. Nos. <u>10-110-932 y 10-110-932</u> y declara (n) que el contenido del anterior documento es cierto y que la (s) firma (s) que lo autoriza (n) fue (ron) puesta (s) por el (los). En constancia se firma esta en Pereira.

EL CESIONARIO:

[Signature]

LUIS ENRIQUE ARANGO JIMENEZ
C.C. No. 10.059.486 de PEREIRA
Rector
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

Luis G. Gutiérrez



MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALISO ANDINO

RESUMEN

La invención consiste en un método para detectar la estabilidad genética del material proveniente de la micropropagación del árbol aliso andino mediante embriogénesis somática, empleando los marcadores moleculares AFLP®, concretamente es posible la verificación de los "fingerprinting o huellas digitales de ADN" empleando cuatro combinaciones específicas de cebadores. El método también incluye un eficiente procedimiento para la extracción de ADN de aliso. Dicha metodología de detección es aplicable a callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero y árboles adultos.

ESTADO DEL ARTE Y ANTECEDENTES

La micropropagación por organogénesis en varias especies del género *Alnus* ha sido ampliamente reportada. Entre las especies de aliso exitosamente multiplicadas por brotación axilar se pueden citar: *Alnus glutinosa* (Perinet y Lalonde, 1983; Lavarde et al., 1987), *Alnus crispa* (Tremblay et al., 1984), *Alnus nepalensis* (Kaur et al., 1993), *Alnus cremastogyne* (Tang et al., 1996), *Alnus* spp (Cremiere, et al. 1987; Vestri et al. 1991; Dhawan et al. 1993),. Además, Wakita et al., (1997), consiguieron la regeneración de plantas a partir de protoplastos de hojas de *Alnus firma*.

En la especie *Alnus acuminata* se han publicado diversos trabajos sobre micropropagación por organogénesis. Hodson et. al. (1988), emplearon yemas axilares; Badilla et al. (1992), partieron de segmentos nodales; González y Vilca (1998), lograron la multiplicación a partir de microestacas de aliso (ecotipo blanco) y Enrico (2000), logró múltiples brotes a partir de epicótilos.

En el género *Alnus* existen, además, reportes sobre formación de callo a partir del tejido del cambium vascular, nódulos de raíz, segmentos de vástago y hojas (Gautheret, 1934; Bychenkova, 1964; Becking, 1965; Simola, 1981). La formación de colonias celulares fue obtenida a partir de protoplastos de hoja de *Alnus glutinosa* y plántulas de *Alnus incana* (Huhtinen et al. 1982). Además, se obtuvo callo friable y de rápido crecimiento a partir de hojas de *Alnus crispa*, *Alnus glutinosa* y *Alnus incana*. Este material se mantuvo durante más de año y medio sin cambios visibles en su tasa de crecimiento y otras características (Tremblay et al. 1986).

En aliso andino, Hodson et al. (1983), describieron formación de callo en segmentos

diferentes concentraciones de NAA y BAP. También, Badilla et al. (1993), trabajando con ápices y segmentos nodales de *Alnus acuminata* spp. *arguta* lograron formación de callo empleando BAP.

A pesar de los trabajos publicados sobre formación de callo, no se ha encontrado antecedentes sobre trabajos en embriogénesis somática, ni directa ni indirecta, en ninguna especie del género *Alnus*, aparte de la reportada en *Alnus acuminata* H.B.K. (Gutiérrez, 2001).

ESTABILIDAD GENETICA O VARIACIÓN SOMACLONAL EN FORESTALES

A pesar de que la variación en plantas regeneradas en cultivos *in vitro* ha sido observada por largo tiempo, sólo en años recientes se ha reconocida su importancia. Las plantas regeneradas a partir de callo han sido denominadas "calliclones" (Skirvin, 1978) y las regeneradas a partir de protoplastos "protoclones" (Shepard, 1981). Larkin y Scowcroft 1981, propusieron un término más general, "somaclones", para las plantas regeneradas a partir de cualquier tipo de célula somática, y a la variabilidad genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro*, la llamaron "variación somaclonal". Este fenómeno ocurre en todos los sistemas de regeneración que incluyan una fase de callo, tanto si la morfogénesis se verifica por organogénesis adventicia o a través de embriogénesis somática (Lindsey y Jones 1989).

Según Ahuja (1998), durante las dos pasadas décadas, no sólo se ha logrado un considerable progreso en la regeneración de plantas en cultivo *in vitro*, sino que también se ha observado un cierto grado de variación somaclonal en las plantas regeneradas de especies forestales. Lester y Berbee (1977) fueron los primeros en registrar sistemáticamente la variación en los regenerantes *in vitro* de árboles. Observaron un amplio rango en altura, número de ramas, rasgos de la hoja y números cromosómicos en los regenerantes derivados de callos de álamo negro y de álamo euroamericano.

Se ha observado también la variación somaclonal en otras especies de *Populus*, así como también en otros géneros forestales. Por ejemplo, se han descrito cambios en la morfología de la hoja y del grosor del tallo en somaclones de álamo (Antonetti y Pinon, 1993). Hojas variegadas han sido observadas en plantas regeneradas de *Liquidambar styraciflua* (Brand y Lineberger, 1988), y *Paulownia tomentosa* (Marcotrigiano y Jagannathan, 1988). Plantas variegadas y diferencias en la morfología de la raíz han aparecido también en somaclones de *Populus tremula* (Ahuja, 1998). Además se han descrito cambios en los niveles de ploidía tanto en callos de álamo (Son et al., 1993) como en las plantas regeneradas a partir de los mismos. Algunos de los somaclones exhibieron rasgos de las hojas característicos de los poliploides (Antonetti y Pinon, 1993; Jehan et al., 1994). Se ha descrito también

variación somaclonal para caracteres de resistencia a la sal, a herbicidas o enfermedades (Ahuja, 1998).

Aunque, los cultivos celulares de gimnospermas se han considerado relativamente más estables que los de las angiospermas, se ha observado también variación somaclonal en especies como *Pinus taeda*, *Abies alba*, *Picea glauca* y *Picea abies* (Ahuja, 1998).

La variación somaclonal puede ser una excelente herramienta para la mejora de forestales mediante programas de selección clonal. Sin embargo, en el contexto de la micropropagación de forestales, si el objetivo a medio o largo plazo es la multiplicación comercial de clones seleccionados para explotación de su madera o bien con propósitos ecológicos de reforestación, la variación somaclonal es un fenómeno indeseable (Moreno 1997).

Hay muchos factores que pueden influir en la tasa de variación somaclonal. Estos incluyen el genotipo; la edad de la planta donante; la fuente del explante; el tipo de morfogénesis (directa, casi directa e indirecta); la vía morfogénica (organogénesis o embriogénesis); los componentes del medio de cultivo, particularmente las hormonas; la cantidad de tiempo en que son mantenidos los cultivos; los regímenes de cultivo; el nivel de ploidía del material de partida, etc. (Karp y Bright, 1985; Skirvin et al. 1994; Moreno, 1997; Ahuja, 1998).

Para Moreno (1997) el tipo de morfogénesis (directa o indirecta) es el factor más determinante sobre la tasa de variación. En procesos de regeneración directa no cabe esperar más variación que la preexistente en el material de partida (quimerismo estructural, mixoploidía en los explantes, mutaciones somáticas). En cambio, el crecimiento inicialmente desorganizado (con la subsiguiente formación de callo) genera toda una gama de desórdenes de tipo metabólico y estructural (por ejemplo los relacionados con la asimetría de los procesos de división celular) que se traducen en variación, tanto epigenética como genética y, dentro de esta última, en diversos tipos de cambios: puntuales, estructurales o numéricos.

La exposición de las células a niveles relativamente altos de reguladores de crecimiento, tales como el ácido 2,4 diclorofenoacético (2,4-D), el ácido naftalénacético (NAA), citoquininas, etc., los cuales se encuentran en los medios de cultivo a concentraciones varias veces más altas que las existentes en condiciones fisiológicas endógenas, pueden jugar un papel importante en la tasa de variación somaclonal. Esto se debe no a sus efectos directos sobre la tasa de mutación, sino a los de tipo indirecto como, por ejemplo, el efecto que producen sobre el grado de desorganización celular, la asimetría de las mitosis y la velocidad de la división celular (Moreno, 1997).

Según Henry (1998), la variación somaclonal incluye un amplio espectro de cambios genéticos. La mayoría de los cambios estructurales y numéricos pueden ocurrir durante el cultivo de tejidos de las células vegetales. Es muy común que se reporte la duplicación cromosómica y el incremento de ploidía. También existen cambios mínimos en el genoma que pueden afectar a una o pocas bases. La abundante presencia de elementos trasponibles (sobre todo retroelementos) en las plantas es una de las fuentes primarias, tanto de cambios puntuales como de diversos tipos de cambios estructurales. Por otro lado, aparte de la variación en los genomas nucleares, también puede producirse variación en los genomas de cloroplastos y de mitocondrias (Shirzadegan et al. 1991).

Deverno (1995), realizó una revisión de la variación somaclonal en procesos de embriogénesis somática de forestales y concluyó que este fenómeno puede ser de gran importancia para la mejora de estas plantas. Sin embargo, como se ha dicho, la variación somaclonal puede ser indeseable sobre todo cuando el propósito es la propagación clonal.

Los cambios epigenéticos se incluyen a veces dentro de la variación somaclonal (De Klerk, 1990). Estos cambios aparecen frecuentemente en plantas regeneradas como resultado de las respuestas fisiológicas de las células a las condiciones impuestas en el cultivo y la regeneración. Muchos de estos cambios fenotípicos no son heredables y pueden no mostrarse en las subsiguientes generaciones. Sin embargo, algunos pueden conducir a cambios en la expresión de los genes que persistirían en más de una generación.

DETECCIÓN O ESTIMACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA O VARIACIÓN SOMACLONAL MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

Un marcador genético es cualquier diferencia detectable por distintos medios, controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético. Por definición, un locus marcador tiene que ser polimórfico. El marcador puede utilizarse con una doble finalidad: para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o para marcar otro locus próximo que controle algún carácter de interés (Nuez et al. 2000).

Existen dos clases de marcadores genéticos: morfológicos y moleculares. Los marcadores fenotípicos o morfológicos, tienen muchas limitaciones, pues su expresión está sujeta a las variaciones del medio ambiente, e incluso, algunas de las características morfológicas tienen efectos indeseables. Con frecuencia este tipo de marcadores sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su edad adulta. Además interactúan epistáticamente, limitando el número de marcadores que pueden utilizarse de forma inequívoca en una población segregante (Phillips-Mora et al 1995).

En contraste, los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y presentan un

en sus primeros estados de desarrollo, usando toda la planta o sólo parte de ella. Aparentemente están libres de efectos epistáticos y virtualmente se puede evaluar un número ilimitado de ellos (Phillips-Mora et al. 1995).

Existen dos tipos de marcadores moleculares: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN. Las isoenzimas o aloenzimas fueron los primeros marcadores moleculares usados en genética de plantas. Son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato común pero difieren en su movilidad electroforética. Su análisis se realiza extrayendo las distintas variaciones isoenzimáticas de los tejidos de la planta, tras lo cual, se separan por electroforesis y se visualizan mediante la tinción del gel con colorantes específicos (Henry, 1997). A pesar que se emplearon bastante en años pasados, su utilidad se ve muy limitada por el escaso número de variaciones para ciertas isoenzimas, la escasa reproducibilidad de los patrones obtenidos o su dependencia de las condiciones ambientales y la imposibilidad de contar con suficientes marcadores para cubrir todo un genoma. De hecho las isoenzimas sólo son capaces de marcar una estrecha fracción del genoma total de la planta (Henry, 1997).

Los marcadores de ADN solucionaron este problema, pues existe una cantidad virtualmente ilimitada de ellos. Dentro de ellos se incluyen los basados en Southern (e.g. RFLP), los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (e.g. RAPD®), y los basados en ambos métodos (e.g. AFLP®) (Phillips-Mora et al 1995). Aunque muchos de estos métodos puede ser útiles para el análisis de la variación somaclonal, a nivel molecular, hasta ahora sólo se han aplicado de forma amplia para este propósito los RFLP y los RAPD® (Henry 1998)

El resultado observable del empleo de cualquier tipo de marcadores es un patrón de bandas (o de picos cuando se obtiene con secuenciadores automáticos). Cada banda corresponde a la posición de un fragmento de ADN separado previamente en función de su tamaño por medio de la electroforesis en una matriz porosa, habitualmente un gel de agarosa o acrilamida. La hipótesis de partida es que cada banda corresponde a un alelo de un locus determinado. Si el marcador estudiado es codominante, el heterocigoto muestra dos bandas que se corresponden con las que presentan, en una u otra posición, los respectivos homocigotos. Si el marcador es dominante, sólo existen dos fenotipos: el que presenta una banda y el que no la tiene. La presencia de banda es lógicamente dominante sobre su ausencia.

La interpretación genética de estos patrones de bandas requiere el estudio de su segregación en una o varias poblaciones. Aunque pueden realizarse algunas inferencias genéticas a partir del análisis de una muestra de individuos no relacionados, ésta es siempre incompleta y provisional. Los estudios de herencia son siempre más simples

cuando el número de loci detectados por sonda (en el caso de los RFLP) o reacción (cuando se trata de marcadores derivados de la PCR) es de uno o dos loci. La interpretación suele complicarse cuando aumenta el número de bandas de un patrón determinado porque, aunque algunos loci pueden ser codominantes, es muy difícil identificar con qué están ligados entre sí. Por ello, es preferible optar en estos casos por un análisis de presencia ausencia de banda, que a veces, después del análisis de ligamiento puede permitir la detección de marcadores de herencia codominante segregante (García-Mas et al. 2000).

En consecuencia, los marcadores moleculares pueden ser usados para caracterizar la variación somaclonal con gran precisión y menos esfuerzo que los análisis fenotípicos y citológicos (Cloutier y Landry, 1994). Aún así, conviene ser cautos a la hora de estimar la variación somaclonal sobre la base del empleo de marcadores moleculares porque lo que importa no es tanto la estima de la tasa de cambio en cualquier parte del genoma, como la tasa de variación que afecta a la porción del genoma que realmente se expresa o puede expresarse a lo largo de la vida de la planta.

Los marcadores RAPD® han sido muy utilizados para evaluar la variación somaclonal en plantas, pero algunos autores han expresado ciertas dudas sobre las conclusiones que a veces se obtienen en estos trabajos (Vendrame et al. 1999). Isabel et al. (1993), emplearon RAPD® para evaluar la estabilidad genética en cultivos celulares de *Picea mariana* (Mill.), no llegando a detectar variabilidad genética entre líneas celulares. En otro estudio, Fourré et al. (1997), evaluaron una serie de somaclones de álamo de Noruega, *Picea abies* (L.) Karst. obtenidos por embriogénesis somática y, aunque detectaron variación por análisis citogenético y fenotípico, no observaron nada mediante el empleo de RAPD®, a pesar de utilizar muchos cebadores. Munthali et al. (1996), emplearon RAPD® para la evaluación de somaclones de remolacha obtenidos por organogénesis adventicia. De 5.607 marcadores, solamente tres fueron polimorficos, lo que representa el 0.05% del total.

Según Ahuja (1998), el uso exclusivo de los RAPD® puede que no sea lo más adecuado para detectar la variación somaclonal. Es posible que su uso combinado con los RFLP u otros marcadores moleculares codominantes, tales como SSR incremente el poder de resolución para detectar variación. Para Gupta y Varshney (1999), cada tipo de marcadores escudriña sólo una fracción del genoma y no el genoma completo de la planta, y por tanto el empleo de diferentes marcadores podría ayudar a rastrear diferentes fracciones del mismo. Gupta y Varshney (1999), sugieren que los microsatélites, y los AFLP® pueden ser los marcadores más adecuados para el análisis de variación somaclonal.

Los AFLP® ("Amplified Fragment Length Polymorphism") se desarrollaron a mediados de la

usadas para la generación de diversos tipos de marcadores moleculares: la digestión con enzimas de restricción, propia de los RFLPs, y la PCR, usada para otros muchos marcadores. Los AFLPs consisten en la amplificación vía PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción y ligados a dos adaptadores específicos a las enzimas utilizadas. Dos cebadores complementarios a los adaptadores permitirán una amplificación consistente, sin necesidad de un conocimiento previo de las secuencias del genoma que se desea estudiar. El resultado es un elevado número de bandas por reacción que garantiza la detección de muchos polimorfismos. Usando combinaciones de cebadores diferentes o empleando diferentes enzimas de restricción y sus correspondientes adaptadores, se puede disponer de un número virtualmente ilimitado de marcadores (García-Mas, 2000).

Son en general marcadores dominantes, siendo especialmente indicados para estudios de variabilidad, o para la saturación de zonas determinadas del genoma, para la búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes o su clonaje posicional. Otra ventaja es su alta reproducibilidad (Henry 1997). Sin embargo no están exentos de algunas limitaciones. Young et al. (1999), demostraron que, dependiendo de la combinación de enzimas de restricción, se puede encontrar mayor o menor número de polimorfismos. En sus trabajos con soja, emplearon dos combinaciones de enzimas, EcoR I / Mse I y Pst I / Mse I. Con los primeros hallaron una alta densidad polimórfica, mientras que con los otros, la densidad polimórfica fue inexistente. Esto lo atribuyeron a la notable sensibilidad de la enzima Pst I a la metilación de la citosina. Como consecuencia de esta sensibilidad, se ve muy afectada la detección de los polimorfismos en el genoma de la soja, cuando se usa esta enzima de corte frecuente.

Hasta la fecha, son pocos los estudios publicados sobre análisis de la variación somaclonal en plantas empleando AFLP®. Engelborghs et al. (1998), mostraron el potencial de los AFLP® para detectar variantes somaclonales en *Musa spp.*; Sánchez-Teyer et al. (1998) determinaron la existencia de variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de *Coffea arabica*, por el mismo medio; Vendrame et al. (1999), evaluaron la aplicabilidad de los AFLPs para estimar la tasa de variación de los embriones somáticos de pecan (*Carya illinoensis*); Magadán et al (2001), estudiaron mediante AFLPs, embriones somáticos, plantas regeneradas y plantas de campo de lúpulo, encontrando polimorfismos que permitieron la detección de variantes somaclonales, así como la evaluación del periodo de cultivo de los callos sobre la tasa de variación.

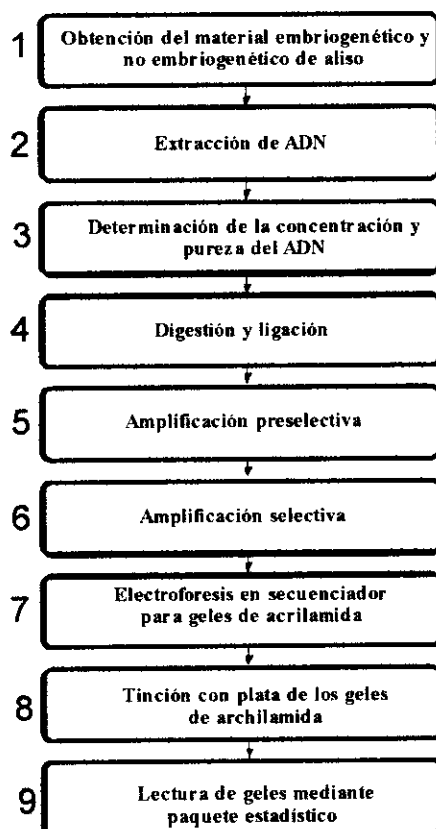
SOLUCIÓN DE LA INVENCIÓN

No existe ningún método de detección de la estabilidad genética del material de *Alnus* *incana* L.P.K. subespecie *acuminata* o aliso andino obtenido a partir de embriogénesis

puede generar cierto grado de variabilidad genética es importante contar con una metodología que garantice la estabilidad genética y el control de calidad de los clones que se obtengan como se presenta en el siguiente invento.

DESCRIPCION DE LA INVENCION Y FIGURA ACOMPAÑANTE:

El método para detectar la estabilidad genética de embriones somáticos de aliso andino comprende 9 etapas:



En la Figura 1 se observa las nueve etapas que se describen a continuación:

Obtención del material embriogénico y no embriogénico de aliso (1)

Para la obtención del material embriogénico y no embriogénico de aliso (1) se utilizan, callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero y árboles adultos de *Alnus acuminata*.

Extracción de ADN (2)

Para la extracción del ADN genómico (2), tanto de callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero y árboles adultos de *Alnus acuminata*, se emplea el método basado en el tiocianato de guanidina (DNAzol®), LIFE TECHNOLOGIES (1987), que hidroliza el ARN y permite la precipitación selectiva del ADN. Se extrae ADN a

- Se pesan y maceran 0.1 g de hoja o el callo en nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvillo fino, el cual se deposita en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contiene 0.3 ml de DNAzol®.
- La mezcla se incuba a 25° C durante cinco minutos con agitación constante.
- Se adicionan 0.3 ml de cloroformo, se mezcla vigorosamente y se incuba a 25° C durante cinco minutos.
- Se centrifuga a 12.000 g en microcentrífuga refrigerada durante 10 minutos, y se transfiere el sobrenadante (fase líquida) a un tubo Eppendorf limpio.
- Para precipitar el ADN, al sobrenadante anterior se le adicionan 0.225 ml de etanol absoluto (100%), y se mezcla por inversión varias veces. Se conserva la muestra a temperatura ambiente por cinco minutos. Opcionalmente se puede incubar la mezcla durante varias horas a -20° C, para obtener una mejor precipitación.
- Se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos y se descarta la fase acuosa (precipitado).
- Se lava el precipitado, el cual puede mostrar diferentes coloraciones, con una mezcla de etanol absoluto y DNAzol® en la proporción 1 : 0.75., adicionando así 0.3 de la mezcla al precipitado y agitando en vortex.
- Se deja reposar la mezcla durante cinco minutos y se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos.
- Se remueve el sobrenadante y se lava el precipitado con 0.3 ml de etanol al 70%.
- Se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos y se descarta el sobrenadante.
- Se descarta el sobrenadante y se deja el tubo invertido por varios minutos, luego de lo cual se disuelve el precipitado con 70 µl de TE a pH 8.0.
- Se agrega ARNasa (30 µg) incubando las muestras de ADN durante una hora a 37° C.
- Se almacenan las muestras conteniendo el ADN genómico a -20° C.
- Opcionalmente se puede observar el ADN total en geles de agarosa al 1% con el propósito de verificar la presencia del ácido nucleico.

Determinación de la concentración y pureza del ADN por espectrofotometría (3)

La determinación de la concentración y pureza del ADN (3) de *Alnus acuminata* extraído mediante tiocianato de guanidina, se realiza por espectrofotometría UV (espectrofotómetro 552, Perkin Elmer) empleando la relación de lectura de OD 260/280 nm (Maniatis et al. 1989). Se calcula la concentración de ADN asumiendo que la concentración de ADN de 50 µg/ml equivale a una OD de 1 a 260 nm.

Concentración de ADN = (OD260) x (Factor de dilución) x (50µg ADN/1 OD).

La relación de 260/280, es una medida de la pureza del ADN y debe permanecer entre 1.6 y 1.9.

Marcadores moleculares AFLP® de tinción con plata.

Los AFLP®, utilizados con el propósito de verificar la estabilidad genética tanto de callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero y árboles adultos de *Alnus acuminata*, se realizan con el conjunto de reactivos AFLP®, el cual suministra ADN de tomate como control. La separación de los productos de amplificación se hace en geles de acrilamida de 38 x 50 cm y en un secuenciador manual para ADN. Las amplificaciones PCR se realizan en termociclador. Se utilizan marcadores de peso molecular de 10-1000 bp. Se corren las muestras de los ADN de aliso, más dos controles positivos y un blanco.

Digestión y ligación (4)

A continuación se describen los pasos para la obtención de los AFLP®, (Vos et al. 1995; García-Mas et al., 2000) así como las condiciones empleadas:

Digestión

Se digieren 100 ng de ADN de las muestras durante 3 h a 37° C con 8 unidades de enzima *Mse* I y 12 unidades de *EcoR* I en tampón 1 x RL (10 mM Tris-acético pH 7.5, 10 mM acetato de magnesio, 50 mM acetato de potasio y 5 mM DTT). El volumen final es de 35 µl.

Ligación

A los 35 µl de la digestión se les añaden 5 µl de una solución que contiene: 5 pmol del adaptador *EcoR* I, 50 pmol del adaptador *Mse* I, (ambos adaptadores se preparan añadiendo cantidades equimolares de cada uno de los dos oligonucleótidos que los constituyen), T4 ADN ligasa, 1,6 mM de ATP y tampón 1 x RL. Se incuba tres horas a 37° C, se diluye hasta un volumen final de 200 µl y se almacena a -20° C para ser utilizado en las siguientes fases.

Amplificación preselectiva (5)

La amplificación preselectiva (5) se realiza mediante amplificación preselectiva (PCR + 1), y consiste en que se amplifican 5 µl de la reacción de ligación diluida con 30 ng de cada cebador (E+1 y M+1), 200 µM de cada dNTP, 1 mM MgCl₂ y 0.45 unidades de *Taq* polimerasa en tampón de pCR (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM KCl, 0.001% gelatina) en un volumen final de 20 µl.

El programa de amplificación es el siguiente: 30 seg a 94° C, 28 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94° C, 1 min de hibridación a 56° C y un min de extensión a 72° C, seguidos de una extensión final de 5 min a 72° C.

Para verificar la amplificación, se corren 3 µl del producto amplificado en un gel de agarosa al 0.9% en electroforesis horizontal, 90 v durante 15 min, tiñendo el gel con bromuro de etidio. Si se observa un bandeo difuso significa que la preamplificación tuvo lugar y se procede a diluir el resto de la PCR + 1 entre 10 y 15 veces con agua estéril, ya que es el sustrato para la amplificación selectiva.

Amplificación selectiva (6)

Teniendo en cuenta el tamaño del genoma en *Alnus* fue necesario realizar las siguientes combinaciones selectivas:

Combinación <i>EcoR</i> / <i>Mse</i> I	Tipo de amplificación selectiva
E-AC X M-CAT	E+2 /M+3
E-AA X M-CTC	E+2 /M+3
E-AC X M-CTC	E+2 /M+3
E-AC X M-CTA	E+2 /M+3

Se amplifican 2,5 µl del producto de la PCR+1 diluída, con 2.5 ng de cebador E+3 y 15 ng del M+3 (según sea el tipo de combinación), 100 µM de cada dNTP, a mM MgCl₂ y 0.223 unidades de *Taq* polimerasa en tampón de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.001% gelatina). El volumen final de la reacción es de 10 µl.

Para la amplificación se emplean 32 ciclos: 1 ciclo inicial de 30 seg a 94° C, 30 seg a 65° C y 1 min a 72° C. A continuación 12 ciclos con una desnaturalización de 30 seg a 94° C, 30 seg de hibridación a una temperatura de 64° C y en cada uno de los ciclos restantes se reduce 0.7° C hasta llegar a 56° C y una extensión de 1 min a 72° C. Se termina la amplificación con 23 ciclos de 1 seg a 94° C, 30 seg a 56° C y 2 min a 71° C, y finalmente un ciclo de 60° C durante 30 min.

Electroforesis en secuenciador para geles de acrilamida (7)

Para la electroforesis en secuenciador para geles de acrilamida (7) se siguen los siguientes pasos:

Preparación del gel de 38x50 cm

Se comienza con la preparación del gel de 38x50 cm. Este se elabora preparando una solución al 6% de acrilamida (19:1 acrilamida-bisacrilamida), 7.5 M de urea y 1 x TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8.0), se filtra. Para los geles de 38 x 50 se añaden 400 µl de persulfato de amonio y 80 µl de TEMED a 100 ml de solución de acrilamida.

La acrilamida se vierte a través de un contenedor que presenta dos vidrios separados entre sí por separadores muy delgados de papel, que facilitan que la acrilamida polimerice (durante 45 minutos) en una fina capa a través de la cual correrán las muestras durante la electroforesis. Se debe evitar la formación de burbujas limpiando muy bien los vidrios. A uno de los vidrios se le impregna de silicona con el fin de poderlo separar al finalizar la electroforesis.

Preparación de las muestras

A los 10 µl del producto de la amplificación selectiva se les añade 10 µl de un tampón de carga constituido por 98% de formamida desionizada, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.025% de xilencianol y 0.025% de azul de bromofenol. Se desnaturaliza durante 3 minutos a 90° C y se conserva inmediatamente en hielo.

Siembra de las muestras y de la electroforesis

La electroforesis se corre en un tampón 1x TBE. En el gel ya polimerizado y precalentado a 50° C, se cargan 2 µl de cada muestra. La electroforesis se lleva a cabo a una potencia constante que proporciona una temperatura de electroforesis de 50° C (80 W).

Tinción con plata de los geles de acrilamida (8)

La tinción con plata de los geles de acrilamida (8) (Bassam et al. 1991) de 38 x 50 cm, se llevó a cabo con el conjunto de reactivos "DNA Silver Staining System" de Promega Corporation. Para los procedimientos de fijación, enjuagues y revelado se emplea un agitador orbital donde se alojan las bandejas de tinción.

- Al finalizar la electroforesis, se separan cuidadosamente los vidrios, retirando los espaciadores.
- Se coloca el gel en cubetas (de acero inoxidable, acrílico, etc) que puedan albergar los vidrios de 38 x 50 cm.
- Se sumerge el vidrio conteniendo el gel en solución mixta de parada y fijación que

- Se enjuaga el gel del tratamiento anterior en agua desionizada durante 2 minutos (repitiéndose el procedimiento dos veces)
- Se sumerge el gel en la solución de tinción consistente en nitrato de plata al 1% y formaldeído a 37%, durante 30 min.
- Se realiza un enjuague en menos de 10 segundos. Esta etapa del proceso es crítica.
- Se pasa el gel a la solución reveladora que contiene carbonato de sodio 30%, formaldeído al 37% y tiosulfato de sodio 10 mg/ml., durante 2 a 5 minutos, hasta que las bandas sean visibles.
- Se adiciona directamente a la solución reveladora solución de parada del revelado (ácido acético al 10%) dejándose durante 5 min.
- Finalmente, se enjuaga el gel en agua desionizada durante 2 min.
- El gel debe dejarse en posición vertical para su secado por espacio de aproximadamente ocho horas. A partir de lo cual se pasa a papel fotográfico, o se puede fotografiar o bien fotocopiar en color para obtener una mayor resolución (Gutiérrez 2001b).

Lectura de geles mediante paquete estadístico (9)

Los análisis se realizan en el paquete estadístico (9) NTSYSpc (Rohlf 1997) versión 2.01i. Los dendogramas de similitud se construyeron con el algoritmo UPGMA (*unweighted pairwise groups method arithmetic average*) y se corren igualmente con en el paquete estadístico NTSYSpc (Rohlf 1997) versión 2.01i.

Para el análisis de la similitud se emplea el coeficiente de Dice (1945), también llamado coeficiente de Nei y Li, (1979).

Donde la similitud es igual a $2a/(2a+b+c)$.

		J	
		+	-
I	+	a	b
	-	c	d

Siendo:

a : las bandas presentes en j y en i

b : las presentes en i y no en j

c : ausentes en i y presentes en j

d : ausentes en ambas

Según Nei (1987) distancia genética es cualquier medida cuantitativa de la diferencia genética, a nivel de frecuencias alélicas o de secuencias del ADN, estimada entre

Esta puede expresarse como la probabilidad de que dos variantes tomadas al azar en la población sean diferentes (diversidad genética) o como la proporción de variantes diferentes del total de variantes presentes entre dos poblaciones, individuos o grupos (disimilitud) (Cornide, 2000)

Dos tipos de datos se usan en estos estudios:

Discretos: La mayoría de tipo binario que denotan la presencia o la ausencia de un carácter, fragmento o banda; otros son de tipo multiestilado, como por ej., el polimorfismo de las secuencias de nucleótidos donde puede haber 4 variantes (A, G, T, C) por sitio.

Continuos: cuando se emplean distancias entre cada par de individuos, especies o secuencias estudiadas.

La hipótesis general es que las características usadas en estos estudios son independientes entre sí.

El uso de marcadores moleculares proporciona una información en cuanto a presencia-ausencia de bandas, por lo que para establecer la similitud entre especies, variedades, etc. Se requiere del uso de índices de similitud binarios.

REIVINDICACIONES

1. Método para detección de la estabilidad genética a partir de embriogénesis somática especialmente del material obtenido de *Alnus acuminata* H.B.K. subespecie *acuminata* o aliso andino caracterizado porque comprende los siguientes pasos a saber:

- Obtención del material embriogénico y no embriogénico de aliso
- Extracción de ADN
- Determinación de la concentración y pureza del ADN
- Digestión y ligación del ADN
- Amplificación preselectiva
- Amplificación selectiva con cuatro cebadores específicos por reacción.
- Electroforesis en secuenciador para geles de archilamida.
- Tinción con plata de los geles de archilamida.
- Lectura de geles mediante paquete estadístico.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la obtención del material genético se toma de callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero o árboles adultos de *Alnus acuminata*.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque en la extracción del ADN se emplea el método basado en el tiocianato de guanidina, que hidroliza el ARN y permite la precipitación selectiva del ADN.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 1 y 3 porque se extrae ADN a partir de 0.1 gramos de tejido.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, 3 y 4 caracterizado porque se utiliza para la extracción del ADN un protocolo de extracción que consiste en los siguientes pasos:

- Pesar y macerar 0.1 g de hoja o el callo en nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvillo fino, el cual se deposita en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contiene 0.3 ml de DNAzol®.
- La mezcla se incuba a 25° C durante cinco minutos con agitación constante.
- Se adicionan 0.3 ml de cloroformo, se mezcla vigorosamente y se incuba a 25° C durante cinco minutos.
- Se centrifuga a 12.000 g en microcentrífuga refrigerada durante 10 minutos, y se transfiere el sobrenadante (fase líquida) a un tubo Eppendorf limpio.
- Para precipitar el ADN, al sobrenadante anterior se le adicionan 0.225 ml de etanol

temperatura ambiente por cinco minutos. Opcionalmente se puede incubar la mezcla durante varias horas a -20°C , para obtener una mejor precipitación.

- Se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos y se descarta la fase acuosa (precipitado).
 - Se lava el precipitado, el cual puede mostrar diferentes coloraciones, con una mezcla de etanol absoluto y DNAzol® en la proporción 1 : 0.75., adicionando así 0.3 de la mezcla al precipitado y agitando en vortex.
 - Se deja reposar la mezcla durante cinco minutos y se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos.
 - Se remueve el sobrenadante y se lava el precipitado con 0.3 ml de etanol al 70%.
 - Se centrifuga a 5.000 g durante 4 minutos y se descarta el sobrenadante.
 - Se descarta el sobrenadante y se deja el tubo invertido por varios minutos, luego de lo cual se disuelve el precipitado con 70 μl de TE a pH 8.0.
 - Se agrega ARNasa (30 μg) incubando las muestras de ADN durante una hora a 37°C .
 - Se almacenan las muestras conteniendo el ADN genómico a -20°C .
 - Opcionalmente se puede observar el ADN total en geles de agarosa al 1% con el propósito de verificar la presencia del ácido nucleico.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque en su etapa la determinación de la concentración y pureza del ADN extraído se realiza por espectrofotometría UV.
 7. Método de acuerdo con la reivindicación 1 y 6 caracterizado porque para la determinación de la concentración y pureza del ADN se emplea una relación de lectura de OD 260/280 nm, que es una medida de pureza del ADN y que el resultado debe permanecer ente 1.6 y 1.9.
 8. Método de acuerdo con la reivindicación 1, 6 y 7 caracterizado porque se calcula la concentración de ADN de una relación donde la concentración de ADN de 50 $\mu\text{g/ml}$ equivale a una OD de 1 a 260 nm. (Concentración de ADN = $[\text{OD}260] \times [\text{Factor de dilución}] \times [50 \mu\text{g/ml ADN} / 1 \text{ OD}]$). método
calcula en
[ADN]
 9. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque se verifica la estabilidad genética de la muestra a través un el conjunto de reactivos AFLP® para la generación de los marcadores moleculares. Método
 10. Método de acuerdo con la reivindicación 1 y 9 caracterizado porque utiliza el conjunto de reactivos AFLP® para las etapas de digestión y litigación, amplificación preselectiva y amplificación selectiva con cuatro cebadores específicos por reacción. después
AFLP.

11. Método de acuerdo con la reivindicación 1, 9 y 10 que en su etapa de digestión y litigación describe los siguientes pasos y condiciones:

st.
AFLP.

- Digestión: Se digieren 100 ng de ADN de las muestras durante 3 h a 37° C con 8 unidades de enzima Mse I y 12 unidades de EcoR I en tampón 1 x RL (10 mM Tris-acético pH 7.5, 10 mM acetato de magnesio, 50 mM acetato de potasio y 5 mM DTT); obteniéndose un volumen final de 35 µl en el proceso de digestión.
- Litigación: Se toman los 35 µl de la digestión se les añaden 5 µl de una solución que contiene: 5 pmol del adaptador EcoR I, 50 pmol del adaptador Mse I, T4 ADN ligasa, 1,6 mM de ATP y tampón 1 x RL.

12. Método de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque en la fase de litigación los 5 µl de la solución que se agrega que contiene 5 pmol del adaptador EcoR I y 50 pmol del adaptador Mse I, se prepara añadiendo a cada uno de los dos adaptadores cantidades equimolares de cada uno de los dos oligonucleótidos que los constituyen.

st AFLP.

13. Método de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque en la fase de litigación la solución obtenida se incuba tres horas a 37° C, se diluye hasta un volumen final de 200 µl y se almacena a -20° C para ser utilizado en las siguientes fases.

st AFLP.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque en la etapa de amplificación preselectiva se amplifican 5 µl de la reacción de ligación diluída con 30 ng de cada cebador (E+1 y M+1), 200 µM de cada dNTP, 1 mM MgCl₂ y 0.45 unidades de Taq polimerasa en tampón de pCR (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM KCl, 0.001% gelatina) en un volumen final de 20 µl.

15. Método de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque en la etapa de amplificación preselectiva se utiliza un proceso de amplificación que sigue por los siguientes pasos:

- 30 segundos a 94° C
- 28 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C
- 1 min de hibridación a 56° C
- 1 min de extensión a 72° C
- seguidos de una extensión final de 5 min a 72° C.

16. Método de acuerdo con la reivindicación 11 y 15 caracterizado porque en la etapa de

st AFLP.

al 0.9% en electroforesis horizontal, 90 v durante 15 minutos, tiñendo el gel con bromuro de etidio. Si se observa un bandeo difuso significa que la preamplificación tuvo lugar y se procede a diluir el resto de la PCR + 1 entre 10 y 15 veces con agua estéril, ya que es el sustrato para la amplificación selectiva.

17. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la etapa de amplificación selectiva se realiza con cuatro cebadores específicos por reacción que presentan las siguientes combinaciones:

Combinación <i>EcoR</i> / <i>Mse</i> I	Tipo de amplificación selectiva
E-AC X M-CAT	E+2 /M+3
E-AA X M-CTC	E+2 /M+3
E-AC X M-CTC	E+2 /M+3
E-AC X M-CTA	E+2 /M+3

18. Método de acuerdo con la reivindicación 1 y 17 caracterizado porque la etapa de amplificación selectiva se emplean 32 ciclos: 1 ciclo inicial de 30 seg a 94° C, 30 seg a 65° C y 1 min a 72° C. A continuación 12 ciclos con una desnaturalización de 30 seg a 94° C, 30 seg de hibridación a una temperatura de 64° C y en cada uno de los ciclos restantes se reduce 0.7° C hasta llegar a 56° C y una extensión de 1 min a 72° C. Se termina la amplificación con 23 ciclos de 1 seg a 94° C, 30 seg a 56° C y 2 min a 71° C, y finalmente un ciclo de 60° C durante 30 min.
19. Método de acuerdo con la reivindicación 18 caracterizado porque en la etapa de la etapa de amplificación selectiva se obtiene un volumen final de reacción de 10 µl.
20. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa de electroforesis en secuenciador de geles de acrilamina se prepara una solución al 6% de acrilamida (19:1 acrilamida-bisacrilamida), 7.5 M de urea y 1 x TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8.0), se filtra.
21. Método de acuerdo con la reivindicación 20 caracterizado porque en la etapa de electroforesis en secuenciador de geles de acrilamina se prepara un gel de 38cm x 50cm al que se añaden 400 µl de persulfato de amonio y 80 µl de TEMED a 100 ml de solución de acrilamida.
22. Método de acuerdo con la reivindicaciones 20 y 21 caracterizado porque en la etapa de electroforesis en secuenciador de geles de acrilamina, la acrilamina se someta a un procedimiento para que se polimerice a través de un contenedor fabricado en

23. Método de acuerdo con la reivindicación 19 caracterizado porque se preparan muestras para la tinción de geles a partir de los 10 μ l del producto de la amplificación selectiva, añadiendo a este 10 μ l de un tampón de carga constituido por 98% de formamida desionizada, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.025% de xilencianol y 0.025% de azul de bromofenol y finalmente se desnaturaliza durante 3 minutos a 90° C y se conserva inmediatamente en hielo.
24. Método de acuerdo con la reivindicación 23 caracterizado porque se realiza una siembra de las muestra y de la electroforesis para la tinción de geles, cargando 2 μ l de cada muestra en el gel ya polimerizado y precalentado a 50° C y corriendo la electroforesis en un tampón 1x TBE, a una potencia constante de 80 W que proporciona una temperatura de electroforesis de 50° C.
25. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 22 caracterizado porque la etapa de tinción con plata de los geles de acrilamida de 38x50 cm se lleva a cabo con un conjunto de reactivos de ADN.
26. Método de acuerdo con la reivindicación 25 caracterizado porque la etapa de tinción con plata se utiliza el conjunto de reactivos "DNA Silver Staining System" de Promega Corporation. *Marq*
27. Método de acuerdo con la reivindicaciones 25 y 26 caracterizado porque la etapa de tinción con plata involucra procedimientos para fijación, enjuagues y revelado a través del empleo de un agitador orbital donde se alojan las bandejas de tinción.
28. Método de acuerdo con la reivindicaciones 25, 26 y 27 caracterizado porque la etapa de tinción con plata se realizan los siguientes pasos: *et. anal.*
- Al finalizar la electroforesis, se separan cuidadosamente los vidrios, retirando los espaciadores.
 - Se coloca el gel en cubetas (de acero inoxidable, acrílico, etc) que puedan albergar los vidrios de 38 x 50 cm.
 - Se sumerge el vidrio conteniendo el gel en solución mixta de parada y fijación que contiene ácido acético al 10% durante 20 min
 - Se enjuaga el gel del tratamiento anterior en agua desionizada durante 2 minutos (repitiéndose el procedimiento dos veces)
 - Se sumerge el gel en la solución de tinción consistente en nitrato de plata al 1% y formaldeído a 37%, durante 30 min.
- Se realiza un enjuague en menos de 10 segundos. Esta etapa del proceso es crítica.

- Se pasa el gel a la solución reveladora que contiene carbonato de sodio 30%, formaldeído al 37% y tiosulfato de sodio 10 mg/ml., durante 2 a 5 minutos, hasta que las bandas sean visibles.
- Se adiciona directamente a la solución reveladora solución de parada del revelado (ácido acético al 10%) dejándose durante 5 min.
- Finalmente, se enjuaga el gel en agua desionizada durante 2 min.
- El gel debe dejarse en posición vertical para su secado por espacio de aproximadamente ocho horas. A partir de lo cual se pasa a papel fotográfico, o se puede fotografiar o bien fotocopiar en color para obtener una mayor resolución (Gutiérrez 2001b).

29. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la etapa de lectura de geles se hace mediante paquete estadístico, aplicando para el análisis de la similaridad el coeficiente de Dice, también llamado coeficiente de Nei y Li *Análisis de datos*
30. Método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque los dendogramas de similaridad se construyen con algoritmo UPGMA (unweighted pairwise groups method arithmetic average) *Análisis de datos*
31. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1, 29 y 30 caracterizado porque la etapa de lectura de geles se hace mediante paquete estadístico NTSYSpc *Análisis de datos*
32. Método de acuerdo con la reivindicaciones 29 caracterizado porque el resultado de la similaridad es igual a: $2a / (2a + b + c)$ así:

$$I \begin{array}{c|cc} & \begin{array}{c} J \\ + \quad - \end{array} \\ \hline + & a & b \\ - & c & d \end{array}$$

*Equation
coef Nei y Li 1978*

Donde:

- a : las bandas presentes en j y en i
b : las presentes en i y no en
c : ausentes en i y presentes en j
d : ausentes en ambas

33. Método de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que garantiza la estabilidad genética y control de los clones que se obtengan del material de *Alnus acuminata* H.B.K. subespecie *acuminata* o *aliso andino*. *Resultados de control*

RESUMEN

La invención consiste en un método para detectar la estabilidad genética del material proveniente de la micropropagación del árbol aliso andino mediante embriogénesis somática, empleando los marcadores moleculares AFLP®, concretamente es posible la verificación de los "fingerprinting o huellas digitales de ADN" empleando cuatro combinaciones específicas de cebadores. El método también incluye un eficiente procedimiento para la extracción de ADN de aliso. Dicha metodología de detección es aplicable a callos embriogénicos, embriones somáticos, plántulas in vitro, plántulas de vivero y árboles adultos.

29
30

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

() ()

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()
- Descripción de la invención. () ()
- Dibujos de ser estos pertinentes. () ()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. () ()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. () ()
- Representación gráfica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:



Fecha:

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ
SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
REGISTRARÍA DE MARCAS Y DISEÑOS INDUSTRIALES
CALLE 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
Teléfono: (57) 261 2000 ext. 2000
Página 1 de 1

Folio 31

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ
Apoderado(a) y/o Representante

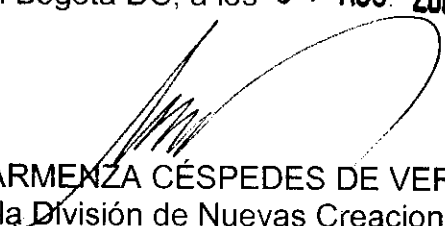
REFERENCIA:

Radicación No.	05 - 58107
Trámite	002
Evento	001
Actuación	416
Oficio No.	672
Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

De acuerdo con lo previsto por el artículo 40 de la Decisión 486/00, la publicación en este caso se hará a partir del **día 15 de diciembre de 2006**.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, a los **31 AGO. 2005**


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones