

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre:

Implementación en *Pinus radiata* de la técnica de AFLP-TP para el estudio de expresión génica en embriogénesis somática

Código

BID-FP-V-2003-1-F-057

Entidad Responsable Postulante Individual :

Pontificia Universidad Católica de Chile
José Felipe Aquea Zeballos

Coordinador

Patricio Arce-Johnson

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad) :

Departamento de Genética Molecular. Unidad de Sistemas biológicos vegetales.
Universidad de Gante, Bélgica

Tipo o modalidad de Formación

Pasantía o entrenamiento

Fecha de realización:

6 de Diciembre- 6 de Marzo

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor (si corresponde)
José Felipe Aquea	PUC	Investigador	



Problema a Resolver: detallar brevemente el problema que se pretendía resolver con la participación en la actividad de formación, a nivel local, regional y/o nacional.

La embriogénesis somática es utilizada en la propagación a gran escala de diversas especies de importancia agrícola y forestal, debido a que permite economizar tiempo y espacio en la producción clonal de plantas, genera material vegetal libre de patógenos y posibilita manipular genéticamente la especie de interés.

Esta técnica ha sido implementada en nuestro laboratorio en *Pinus radiata*, y actualmente esta siendo incorporada en los programas de propagación clonal de las empresas forestales nacionales, incluyendo Forestal Mininco y Forestal Arauco.

Aunque esta técnica ya ha sido implementada exitosamente, aun existen algunos problemas, entre los que se incluyen el bajo número de embriones generados por explante y la baja frecuencia de conversión de embriones somáticos en plantas viables. Actualmente estamos trabajando en la optimización de este proceso mediante el análisis de los requerimientos nutricionales y hormonales durante la maduración de los embriones. Sin embargo, durante este proceso ocurren dramáticos cambios moleculares, los que pueden ser identificados por técnicas moleculares. La identificación de estos cambios expresados como diferencias en la expresión de genes permite por un lado, entender la fisiología del sistema y por otro evaluar el efecto de los tratamientos nutricionales y hormonales en la expresión génica. El conocimiento de los genes que se expresan durante la embriogénesis somática es una estrategia clave en la producción clonal de embriones a gran escala y será la base de la futura producción de plantas forestales comerciales en Chile y el extranjero. Es por este motivo que hemos decidido estudiar la expresión de genes durante la embriogénesis somática en *Pinus radiata*, como una manera de mejorar las condiciones de cultivo y optimizar la producción de embriones que cubra las demandas de la industria forestal chilena. El objetivo del viaje fue conocer y aprender AFLP-TP, una de las técnicas más adecuada para el estudio de expresión génica en *Pinus radiata*.

Con esta actividad se logro a nivel local implementar la técnica de AFLP-TP en nuestro laboratorio, la que será utilizada en *Pinus radiata* y en el futuro será aplicada a otras especies de interés comercial. A nivel nacional se pretende dar a conocer la importancia del uso de esta técnica en el mejoramiento de procesos productivos, tales como la embriogénesis somática en *Pinus radiata*.

Objetivos de la Propuesta

2. Antecedentes Generales: describir si se lograron adquirir los conocimientos y/o experiencias en la actividad en la cual se participó (no más de 2 páginas).

El laboratorio de la Dra. Dominique van der Straeten se encarga de estudiar la interacción entre hipoxia y la señalización hormonal utilizando estudios de expresión génica por medio de AFLP-TP. Debido a ello, no fue difícil implementar esta técnica en *Pinus radiata*. Se lograron adquirir los conocimientos necesarios para aquello, los que serán transmitidos a la comunidad científica nacional y a la industria forestal.

La experiencia adquirida servirá para iniciar nuevas áreas de investigación en nuestro país, tomando como base el estudio de expresión génica.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
6-12-2003	Llegada a Bélgica	Manejar las bases de la técnica AFLP-TP	Ghent-Bélgica
6-3-2004	Llegada a Chile	Implementar la técnica en Chile. Transferir el conocimiento al mundo científico y empresarial	Santiago-Chile

Señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron o se modificaron.

4. Resultados Obtenidos: descripción detallada de los conocimientos adquiridos. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.

El objetivo general de esta actividad fue adiestrarse en el manejo de la técnica AFLP-TP para su implementación en el estudio forestal en Chile. En el laboratorio de la Dra. Dominique Van der Straeten se maneja desde hace varios años esta técnica, por lo que se logró implementar exitosamente en el estudio de *Pinus radiata*. En base a los objetivos específicos propuestos se puede mencionar que se logró manejar las bases de esta técnica, entre las que se encuentran la estandarización de un protocolo de extracción de RNA de tejido embriogénico y no embriogénico de *Pinus radiata* (Anexo 1), el aprendizaje de técnicas moleculares tales como síntesis de cDNA biotinilado, digestión mediante enzimas de restricción, ligación de adaptadores entre otros procesos, necesarios para el desarrollo de la técnica AFLP-TP (Anexo2). Por otra parte, se adquirió el conocimiento necesario para el manejo de radioactividad, esencial para la marcación de partidores.

Esta técnica consiste en la amplificación selectiva mediante PCR de fragmentos de cDNA mediante 128 combinaciones de partidores específicos. En esta pasantía se logró realizar 30 combinaciones, que aproximadamente abarca un 10% del genoma de *Pinus radiata*. El resto de las combinaciones se realizarán en el laboratorio del Dr. Patricio Arce-Johnson en la Pontificia Universidad Católica de Chile.

De las combinaciones realizadas se identificaron bandas (Anexo 5) que corresponden a fragmentos derivados de transcritos o genes (TDF) las que se resumen en la siguiente tabla:

TDF visualizados totales:	1960	100 %
TDF expresados:	70	3.57 %
diferencialmente		
TDF no embriogénicos:	31	1.58 %
TDF embriogénicos:	39	1.99 %

Estos fragmentos están en proceso de ser secuenciados de modo que se pueda determinar concretamente a que genes corresponden y en que proceso biológico participan

Por otra parte se logro identificar los equipos necesarios para el desarrollo de esta técnica y se adquirió la experiencia en el uso de ellos. Entre los equipos utilizados se cuenta un termociclador, equipo utilizado para realizar reacciones de PCR, cámaras de electroforesis del tipo utilizado en la secuenciación de DNA y el uso del equipo Phosphorimager necesario para la visualización de geles radiactivos. Todos los equipos necesarios para el desarrollo de esta técnica se encuentran disponibles en el laboratorio de Bioquímica de la Pontifica Universidad Católica de Chile para la implementación del AFLP-TP en el país

Los conocimientos adquiridos son de gran utilidad no sólo para la técnica de AFLP-TP sino también para otras técnicas de biología molecular, tales como Southern blot, Northern blot, RT-PCR entre otras, las que son de gran utilidad en el estudio de especies vegetales de interés comercial.

A la llegada a Chile se reunieron los equipos necesarios para la implementación en nuestro país de esta técnica, la que se está utilizando en la continuación del estudio iniciado en Bélgica. A futuro esta técnica será utilizada en el estudio de otras especies de interés económico para la empresa forestal, tal como *Eucalyptus globulus*.

Se le informo del estudio realizado al jefe de investigación de la Forestal Mininco Sr. Victor Sierra, quien se encontró interesado en la investigación iniciada en nuestro laboratorio. Así mismo, nos comento la inquietud de aplicar la técnica aprendida en Bélgica en otros procesos biológicos en *Pinus radiata* y en otras especies de interés forestal.

5. Aplicabilidad: explicar la situación actual del rubro en Chile (región), compararla con la tendencias y perspectivas en el país (región) visitado y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región).

El objetivo general de esta actividad de formación era conocer la técnica de AFLP-TP, la que es utilizada para realizar estudios de expresión génica en especies vegetales. En Chile se está iniciando el estudio genómico de especies vegetales de interés comercial, tales como la vid y los duraznos. Estos estudios comprenden la implementación y utilización de técnicas de última tecnología entre las que se encuentran el uso de microarrays. Esta técnica puede ser utilizada solo en especies donde ya se ha iniciado estudios genómicos, debido a que se requiere el conocimiento de parte del genoma de la especie de interés. En el caso de *Pinus radiata*, especie vegetal de mayor valor comercial en nuestro país, aún no se han iniciado estudios genómicos, lo que no permite el uso de los microarrays. Esto último también se extrapola a otras especies vegetales. La carencia de conocimientos genómicos en la realización de estudios de expresión génica puede ser sobrellevada por la técnica de AFLP-TP. Por lo tanto esta técnica puede ser utilizada tanto en pinos como en otras especies de interés para la industria forestal y agrícola.

En Bélgica se utiliza esta técnica como complemento a otras técnicas tales como microarrays y genotecas de expresión. Esto puede ser posible en Chile, donde la genómica se visualiza como la área de investigación en los próximos años.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
Universidad de Ghent	Dominique Van Der Straeten	Profesora	Tel: +32 (0)92645185 Fax: +32 (0)9264 53 33	K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium	Dominique.VanDerStraeten@ruq.ac.be Página web: http://www.hsb.ugent.be/

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar: señalar aquellas iniciativas detectadas en la actividad de formación, que significan un aporte para el rubro en el marco de los objetivos de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevos cursos, participar en ferias y establecer posibles contactos o convenios. Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que aún quedan por abordar para la modernización del rubro.

Con el desarrollo de esta actividad se logró adquirir un vínculo directo con el laboratorio de la Dra. Dominique Van der Straeten en la Universidad de Ghent, el que a futuro se puede materializar con la participación en proyectos en conjunto entre Chile y Bélgica. También esta relación puede ser aprovechada por otros investigadores para el aprendizaje de otras técnicas que son utilizadas en su laboratorio.

8. Resultados adicionales: capacidades adquiridas por el grupo o entidad responsable, como por ejemplo, formación de una organización, incorporación (compra) de alguna maquinaria, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, etc.

Dentro de esta actividad no se adquirió capacidades adicionales

9. Material Recopilado: junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Protocolo extracción RNA <i>Pinus radiata</i>	Anexo 1	A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.
Protocolo AFLP-TP	Anexo 2	AFLP-based transcript profiling
Presentación a científicos	Anexo 3	Identificación de genes expresados diferencialmente durante la embriogénesis somática temprana de <i>Pinus radiata</i> mediante AFLP-TP
Presentación a jefe de investigación Forestal Mininco	Anexo 4	Incorporación de la técnica de AFLP-TP en la optimización del proceso de embriogénesis somática en <i>Pinus radiata</i>
Fotografías genes AFLP-TP	Anexo 5	
Resumen congreso REDBIO	Anexo 6	Identificación de genes que se expresan diferencialmente durante la embriogénesis somática temprana de <i>Pinus radiata</i>

10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo: NO CORRESPONDE

_____ muy difícil _____ sin problemas _____ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

No corresponde, pues se trata de un participante individual.

b. Apoyo de la Entidad Responsable

☒ bueno _____ regular _____ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

☒ amplia y detallada _____ aceptable _____ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

☒ bueno _____ regular _____ malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Por tratarse de un participante individual todo esto fue organizado en forma personal y directa sin participación de FIA.

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	x		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa	x		
Reserva en hoteles	x		
Cumplimiento del programa y horarios	x		

En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar los aspectos organizacionales de las actividades de formación a futuro.

11. Conclusiones Finales

12. Conclusiones Individuales: anexar las conclusiones individuales de cada uno de los participantes de la actividad de formación, incluyendo el nivel de satisfacción de los objetivos personales (no más de 1 página y media por participante).

La realización de la actividad de formación fue valiosa, ya que gracias a ella se pudo implementar en nuestro laboratorio la técnica de AFLP-TP para realizar estudios de expresión génica. Esta actividad permitió iniciar una nueva área de estudio en nuestro país, el estudio molecular de *Pinus radiata*, especie vegetal de mayor importancia comercial para nuestro país. Actualmente se está en el proceso de análisis de los geles realizados en Bélgica y resultados preliminares serán presentados en el V congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, instancia en que se agradecerá al FIA por el apoyo brindado para la ejecución de esta investigación.

Por otra parte, se presentó la actividad realizada al jefe de investigación de la Forestal Mininco, quien considero valiosa la técnica aprendida y se acordó realizar colaboraciones en conjunto en áreas de investigación prioritarias para ellos utilizando la técnica aprendida en esta actividad.

Fecha: 24 Mayo 2002

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: Patricio Añez Jarama

AÑO 2002

ANEXO 1

Commentary

A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees

Key Words: phenolic compounds, pine, *Pinus*, polysaccharides, RNA extraction, RNase

Isolating high quality RNA from pine trees is made difficult by the high concentrations of polysaccharides, phenolics and RNases associated with pine tissue. In seedlings subjected to stressful growth conditions the difficulty is exacerbated. To address this problem we have developed a rapid and facile modification of established techniques which allows preparation of total RNA from tissue within a few hours without the use of toxic and expensive chemicals such as phenol, guanidium isothiocyanate and guanidium hydrochloride or the need for ultracentrifugation. This method can be used on any tissue and is particularly effective on recalcitrant materials such as pine needles.

Materials and Methods

Solutions required. (Use diethylpyrocarbonate-treated water (Sambrook et al., 1989) for all solutions.)

Extraction buffer:

- 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)
- 2% PVP (polyvinylpyrrolidinone K 30)
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 25 mM EDTA
- 2.0 M NaCl
- 0.5g/L spermidine
(mix and autoclave)
- 2% β -mercaptoethanol (add just before use)
- Chloroform:isoamyl alcohol (24:1)

Abbreviations: CTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide; IAA, isoamyl alcohol; SSTe, defined in *Materials and Methods*.

10 M lithium chloride

SSTE:

1.0M NaCl

0.5%SDS

10mM Tris-HCl (pH 8.0)

1mM EDTA (pH 8.0)

Protocol

- Warm 15 mL extraction buffer to 65°C in a water bath, quickly add 2 to 3 g ground tissue and mix completely by inverting the tube.
- Extract two times with an equal volume of chloroform:1AA, separating phases at 10,000 rpm at room temperature in an SS34 rotor. Alternatively a table-top centrifuge can be used, in which case additional extractions may be necessary to maintain purity.
- Add 1/4 volume 10 M LiCl to the supernatant and mix. The RNA is precipitated overnight at 4°C and harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min. Shorter precipitation times may be adequate for some purposes; after 1, 2 and 6 hours of precipitation, the yield was, respectively, 30%, 65% and 90% of that obtained after overnight precipitation.
- Dissolve pellet into 500 µL of SSTE. When poly A(+) RNA is to be extracted, dissolve total RNA in 0.5% SDS instead of SSTE and proceed with selection directly.
- Extract once with equal volume of chloroform:1AA.
- Add two volumes of ethanol to the supernatant, precipitate at -70° for at least 30 min or 2 hours at -20°.
- Spin 20 min in a microcentrifuge to pellet the RNA. Remove supernatant and dry pellet. Resuspend pellet in autoclaved diethylpyrocarbonate-treated water. RNA is now ready for use.

Comment

The major problem in RNA isolation from pines is contamination by polyphenols and polysaccharides. The content of polyphenols in conifers is higher than in deciduous trees and increases with the seedling age (Schneiderbauer et al., 1991). The use of phenol for the extraction of RNA from pine tissues, such as the guanidium hydrochloride method (Sambrook et al., 1989; Baker et al., 1991; Schneiderbauer et al., 1991), result in a brownish precipitate. The yield and the quality of the RNA are very poor (less than 20 µg/g of needles with an A_{260}/A_{280} ratio of less than 1.2). Commercially available preparations utilizing guanidinium isothiocyanate and phenol give higher yields (up to 250 µg/g needles), but the quality is still low (A_{260}/A_{280} less than 1.1). In addition, the RNA

Table I. Yield of RNA from loblolly pine.

Type of Tissue		RNA Recovered ($\mu\text{g/g}$ fresh tissue)	
		5-Year-Old Seedlings	5-Month-Old Seedlings
Drought-stressed	Needles	100–130	130–230*
	Roots	37–50	100–140*
Unstressed	Needles	120–150	150–240
	Roots	40–70	80–110

*8-month-old seedlings

is contaminated with DNA (data not shown). These problems of yield and purity are due mainly to the oxidation of phenolic compounds, which can then bind irreversibly to nucleic acids and coprecipitate with RNA (Schneiderbauer et al., 1991; Katterman and Shattuck, 1983). In order to overcome this problem, we have included PVP and β -mercaptoethanol as reducing reagents in our extraction buffer. Further we use CTAB as the detergent and extract with chloroform instead of phenol to remove proteins. The resulting RNA preparations are colorless.

To eliminate the polysaccharides and CTAB we use 2M NaCl instead of the more usual 0.7 M in the extraction buffer and 1.0 M NaCl in the SSTE buffer used to dissolve the RNA pellet. The high NaCl concentration of the buffers helps remove polysaccharides (Fang, et al., 1992) and dissolves the CTAB-RNA complex, so that more CTAB and polysaccharides are removed in the chloroform extraction. The quality and quantity of RNA prepared by this method are excellent (Table I). The yield ranges from 100 to 240 $\mu\text{g/g}$ depending on the tissue, and the A_{260}/A_{280} ratio is usually 1.7 to 2.0. Even for severely stressed seedlings where the needles appear brown, we still can obtain about 100 μg total RNA/g needles with an A_{260}/A_{280} ratio above 1.7.

By avoiding phenol extraction, damage to poly A(+)-RNA is minimized. The products of cDNA synthesis using poly A(+)-RNA extracted using this protocol ranged from about 0.5 to 4.0 kb with a modal size of about 1.5 kb. cDNA libraries of 1×10^6 to 1×10^7 independent clones have been constructed from this material (data not shown). Both these results indicate a very high quality template. Visible inspection of RNA on ethidium bromide-stained formaldehyde gels and the results of northern

analysis confirm that there is little degradation of RNA extracted from needles, stems, or roots.

Acknowledgments: This work was supported by the Temple-Inland Foundation and the Texas Agricultural Experiment Station.

Shujun Chang, Jeff Puryear and John Cairney
Department of Forest Science, Texas A&M University,
College Station, Texas 77843-2135, USA

References

- Baker, S. S., C. L. Rugh, and J. C. Kamalay. 1990. RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *Biotechniques* 9(3):268-272.
- Fang, G., S. Hammar, and R. Grunet. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13:52-55.
- Katterman, F. R. H., and V. L. Shattuck. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Prep. Biochem.* 13:347-359.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schneiderbauer, A., H. Sandermann Jr., and D. Ernst. 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal. Biochemistry* 197:91-95.

ANEXO 2

AFLP-BASED TRANSCRIPT PROFILING

The AFLP-based transcript profiling protocol (AFLP-TP) is an improved version of the cDNA-AFLP method described by Bachem et al. (Plant J. 9: 745-753, 1996). AFLP-TP is a fragment-based, genome-wide expression technique allowing the analysis of “all” genes involved in a particular biological process or expressed under certain conditions. In the approach, unique transcript tags derived from the 3' end region of expressed genes are PCR amplified and displayed on acrylamide gels. Selective amplification of subsets of transcript tags allows to fractionate the initial pool of tags and to detect low abundant messengers. Because it is PCR based and because of the fractionation, the sensitivity is significantly higher compared to other techniques including microarrays. Furthermore, as it is a fragment-based technique, it allows to discriminate between homologous sequences provided that distinct restriction fragments are obtained from the homologues.

The first step in the AFLP-TP approach is the conversion of mRNA into ds cDNA using a biotinylated oligo-dT primer. We start with about 2 ug total RNA for cDNA synthesis.

The cDNAs are digested with two restriction enzymes in a two-step reaction. After digestion with the first enzyme, the 3' most regions are captured on dynabeads. Digestion with the second enzyme releases the restriction fragments or transcript tags. The enzymes have been chosen such that the majority of the cDNAs is cut. The combination used in the protocol (*Bst*YI and *Mse*I) cuts around 80% of all messengers (based on in silico analysis using available full-length cDNA sequences). Around 10% of the fragments is however too small or too large to be displayed on acrylamide gels. Almost 70% of the fragments are *Bst*YI/*Mse*I fragments, the other 10% are *Mse*I/*Bst*YI fragments. To screen all of them, the two series of analyses have to be done, with as first cutting enzyme *Bst*YI and *Mse*I, respectively.

*Bst*YI recognizes the sequence PuGATCPy and after digestion and adapter ligation, a pre-amplification is done using a *Bst*YI-primer with a T or C as 3' nucleotide. In this way, the total pool of fragments is subdivided in two. In a subsequent amplification, selective primers are used. Increasing the number of selective nucleotides reduces the number of fragments amplified but results in amplification of fragments that are derived from low abundant messengers. Usually, primers with 1 or 2 selective nucleotides are used. In several plant species, a total of 3 selective nucleotides (e.g. *Bst*YI+1 and *Mse*I+2 primers) results in profiles that are not too dense, while the sensitivity is already high enough to detect low abundant messengers.

After generating profiles, differentially expressed genes can readily be detected and isolated from the gels for further characterization. Depending on the density of the gel pattern, good quality sequence can be obtained for 50% to 80% of the isolated fragments by direct sequencing.

1. Total RNA isolation

Total RNA is isolated using the “Trizol”-method.

To check the yield/quality of the isolated RNA, a sample (1/10 of the total) is analyzed on an agarose gel. The RNA should appear as a faint smear from approximately 10 kb down, with trace rRNA bands. Spectrophotometric determination of the concentration ($A_{260}=1$ corresponds to 40 $\mu\text{g/ml}$) and purity (A_{260}/A_{280}) can be done.

2. Double stranded cDNA synthesis

- First strand cDNA synthesis :

Add together	20 μl total RNA (~2.0 μg)
	1 μl oligo-dT ₂₅ - bio (700 ng/ μl)
	4 μl H ₂ O (DEPC!!!!)
Then add	8 μl 5x First Strand buffer
	4 μl 0.1 M DTT
	2 μl 10 mM dNTPs
	+ 1 μl Superscript II (200 U/ μl)
	40 μl

Incubate 2 hr at 42°C

DEPC-water : 100 ml water + 100 μl DEPC (diethylpyrocarbonate),
Let stand overnight at room temperature and autoclave

- Second strand synthesis :

Add together	40 μl first strand reaction mixture
	16 μl 10x Second Strand buffer (E. Coli ligase buffer)
	3 μl 10 mM dNTPs
	6 μl 0.1 M DTT
	1.5 μl E.coli ligase (10 U/ μl) (or 15 units)
	5.0 μl E.coli polymerase I (10 U/ μl) (or 50 units) (DNA polymerase I)
	1.6 μl RNase-H (1 U/ μl) (or 1.6 units) (Ribonuclease H)
	H ₂ O to 160 μl

Incubate 1 hr at 12°C and 1 hr at 22°C in a thermoblock

Purify the cDNA using a Qiaquick spin column (qiaquick PCR purification kit, qiagen).
Check the quality and yield of cDNA by agarose gel electrophoresis (1 % agarose / 0.5x TAE).

5x First Strand buffer:

250 mM Tris.HCl pH 8.3; 15 mM MgCl₂; 375 mM KCl

10x Second Strand buffer:

188 mM Tris.HCl pH 7.0; 46 mM MgCl₂; 906 mM KCl

1500 μ M NAD⁺; 100 mM (NH₄)₂SO₄

500 ng of the double stranded cDNA preparation is used for AFLP.

3. AFLP template preparation (using *Bst*YI and *Mse*I)

First digestion :

Mix: 20 µl cDNA (500 ng)
10 Units *Bst*YI
4 µl 10x RL-buffer
H₂O to 40 µl

Incubate 2 hrs at 60°C

10x RL-buffer: 100 mM Tris-HAc (pH 7.5), 100 mM MgAc, 500 mM KAc, 50 mM DTT,
50 ng/µl BSA (optional).

Immobilization of 3'-terminal cDNA fragments on dynabeads :

The biotinylated 3'-end fragments are separated from the non-biotinylated fragments by binding to streptavidin beads (Dyna).

- Per sample, wash 10 µl dynabeads once in 100 µl 2x STEX and resuspend it in 40 µl 2x STEX (the same volume as the restricted cDNA) (washing dynabeads for 7-8 samples maximally in one tube).
- Add the beads (40ul) to the restricted cDNA (40ul), to give a final volume of 80 µl.
- Incubate the mixture at room temperature for 30 minutes with gentle agitation (1000 rpm).
- Collect the beads with the magnet, wash once with 100 µl 1x STEX and transfer to a fresh tube.
- Wash **4** additional times with 100 µl 1x STEX
- Resuspend the beads in 30 µl T₁₀E_{0.1} and transfer again to a fresh tube.

2x STEX: 2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM, 0.2 % Triton X-100

Second digestion :

Add to the 30 µl beads-suspension:

10 Units enzyme *Mse*I
4 µl 10x RL-buffer
H₂O to 40 µl

Incubate 2 hr at 37 °C with gentle agitation (1000 rpm) to ensure that beads are resuspended occasionally

Collect the beads using the magnet and transfer the supernatant, containing the liberated template fragments, to a clean tube for the subsequent adapter ligation reaction.

Adapter preparation :

All adapters (*Bst*YI- and *Mse*I-adapter) are non-phosphorylated oligonucleotides

For the *Bst*YI-adapter, mix oligo F and R such that an adapter is obtained at a concentration of 5 pmol/ μ l.

*Bst*YI-F: 5' – CTCGTAGACTGCGTAGT – 3'
*Bst*YI-R: 5' – GATCACTACGCAGTCTAC – 3'

<i>Bst</i> YI adapter : 5 pmol/ μ l	
<i>Bst</i> YI-R (100 μ M)	: 2.5 μ l
<i>Bst</i> YI-F (100 μ M)	: 2.5 μ l
<u>H₂O</u>	<u>: 45 μl</u>
	50 μ l

For *Mse*I, mix oligo F and R such that an adapter is obtained at a concentration of 50 pmol/ μ l.

*Mse*I-F: 5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3'
*Mse*I-R: 5' – TACTCAGGACTCAT – 3'

<i>Mse</i> I adapter : 50 pmol/ μ l	
<i>Mse</i> I-R (100 μ M)	: 25.0 μ l
<u><i>Mse</i>I-F (100 μM)</u>	<u>: 25.0 μl</u>
	50.0 μ l

Adapter ligation :

Add to the supernatant (containing the template fragments: 40 μ l) a mix of 10 μ l containing:

- 1 μ l *Bst*YI adapter (= 5 pmol)
- 1 μ l *Mse*I adapter (= 50 pmol)
- 1 μ l 10 mM ATP (Pharmacia)
- 2 μ l 5 x RL-buffer
- 1 μ l T4 DNA ligase (5 U/ μ l) (or 1 unit) (Pharmacia)
- 10 Units *Bst*YI
- H₂O to 10 μ l

Incubate 3 hrs at 37°C

4. Pre-amplification with non-selective primers

Dilute the adapter ligation 2-fold with T₁₀E_{0.1} and use 5 µl as a template in the pre-amplification. *Bst*YI-T+0 and *Bst*YI-C+0 are combined with the *Mse*I+0 primer

Primers:

*Bst*YIT+0: 5' – GACTGCGTAGTGATCT – 3'

*Bst*YIC+0: 5' – GACTGCGTAGTGATCC – 3'

*Mse*I+0: 5' – GATGAGTCCTGAGTAA – 3'

The reaction contains:

5.0 µl 2-fold diluted adapter ligation

1.5 µl *Bst*YI+0 primer (50 ng/µl = 75 ng)

1.5 µl *Mse*I+0 primer (50 ng/µl = 75 ng)

2.0 µl 5 mM dNTPs (--> 0.2 mM final concentration of each dNTP)

0.2 µl Taq polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer, 5 units/µl) (or 1 unit)

5.0 µl 10x PCR-buffer

H₂O to 50 µl

10x PCR-buffer : 100 mM Tris.HCl pH 8.3, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl

It is advisable to work with mixes of reagents as much as possible to avoid differences in amplification between different reactions; the following procedure is suggested:

Primer mix:

1.5 µl *Bst*YI+0-primer

1.5 µl *Mse*I+0-primer

2.0 µl 5 mM dNTPs

20.0 µl H₂O

Taq mix:

0.2 µl Taq polymerase (5 units/µl)

5.0 µl 10 x PCR-buffer

14.8 µl H₂O

Each reaction contains 5 µl template, 25 µl of primer mix and 20 µl of Taq mix

PCR amplification: **No hot start!!!**

30 sec. 94°C

25 cycles 60 sec. 56°C

60 sec. 72°C

Check the pre-amplification by running 10 µl of the reaction mixture on an agarose gel.

5. Selective amplification-reaction using ^{33}P labeled primer

Primer labeling :

For one single AFLP reaction, 5 ng of labeled primer is needed.

Reaction Mix for ^{33}P :

- 0.1 μl of a 50 ng/ μl primer stock-solution
- 0.1 μl ^{33}P - γ -ATP ($\approx 2000 \text{ Ci/mmol} \approx 50 \text{ pmol}$; Amersham)
- 0.05 μl 10x T4-buffer
- 0.2 units T4-kinase
- H_2O to 0.5 μl

10x T4-buffer: 250 mM Tris.HCl pH 7.5, 100 mM MgCl_2 , 50 mM DTT,
5 mM spermidine (3HCl-form; Sigma)

0.5 μl final volume yields labeled primer at a concentration of 10 ng/ μl

Incubate 45 min at 37°C and, subsequently, 10 min at 80°C (inactivation of the kinase).

The actual reaction volumes depend on the number of AFLP amplifications that need to be performed with the selective primer.

PCR reaction :

For each amplification, 5 μl of a **600-fold dilution** of the pre-amplification mixture is used as template.

A single PCR reaction contains:

- 5.0 μl pre-amplification mix (diluted 600-fold in $\text{T}_{10}\text{E}_{0.1}$)
- 0.5 μl labeled *Bst*YI+N-primer (10 ng/ μl --> 5 ng)
- 6 μl unlabeled *Mse*I+N-primer (5 ng/ μl --> 30 ng)
- 0.8 μl 5 mM dNTPs
- 2.0 μl 10x PCR-buffer
- 0.12 μl AmpliTaq-“Gold” polymerase (5 U/ μl) (0.6 units)
- H_2O to 20 μl

$\text{T}_{10}\text{E}_{0.1}$ -buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA

10x PCR-buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM MgCl_2 , 500 mM KCl

Again, work with mixes. The AFLP-reactions may be done as follows, in case one particular labelled primer is used in combination with many different *MseI*+N primers:

5.0 µl template DNA
5.0 µl *MseI*-primer (dilute stock to 6 ng/µl with H₂O --> 30 ng)
10.0 µl mix; amounts for 100 µl or 10 reactions
 5.0 µl labeled *Bst*YI-primer (10 ng/µl --> 50 ng)
 8.0 µl 5 mM dNTPs
 20.0 µl 10x PCR-buffer
 6 units AmpliTaq-Gold polymerase (1.2 µl of 5 U/µl)
 65.8 µl H₂O

10x PCR – buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl

PCR amplification :

10 min 94°C (**HOT START!!!!**)

13 cycles : 30 sec 94°C
 30 sec 65°C ↓ 0.7 °C/cycle
 60 sec 72°C

23 cycles: 30 sec 94°C
 30 sec 56°C
 60 sec 72°C

Gel analysis :

After PCR amplification, the samples are analyzed on 5% polyacrylamide gels using the Sequigel system (Bio-Rad). Gel electrophoresis is done as in conventional AFLP analysis. A labeled 10 bp sizing standard (Sequamarck, Research Genetics) is included as size marker. After running, the gel is vacuum-dried on a whatmann paper and exposed on a Biomax MR autoradiogram (Kodak) or scanned in a phosphor-imager.

6. Selective amplification- reaction using IRD-700 labeled primers (LI-COR)

PCR- reaction

For each amplification, 5 µl of a **600-fold dilution** of the pre-amplification mixture is used as a template.

A single PCR-reaction contains :

- 5.0 µl pre-amplification mix (600x diluted in T₁₀E_{0.1})
- 0.8 µl IRD-700 labeled *Bst*YI+N primer (6 ng/µl, diluted in T₁₀E_{0.1})
- 3 µl unlabeled *Mse*I+N primer (10 ng/µl, diluted in H₂O)
- 0.8 µl dNTP's (5 mM)
- 2 µl 10x PCR-buffer II (Perkin Elmer)
- 2.4 µl MgCl₂ (25 mM, Perkin Elmer)
- 0.2 µl Ampli TAQ DNA polymerase (5 U/µl, Perkin Elmer)
- H₂O to 20 µl

PCR amplification :

13 cycles	94°C - 10 sec	
	63°C - 30 sec	↓ 0.7 °C/cycle
	72°C - 60 sec	

25 cycles	94 °C - 10 sec	
	54 °C - 30 sec	
	72 °C - 60 sec	↑ 1 sec/cycle

72 °C - 2 min

Gel Analysis :

After PCR amplification, the samples are analyzed on a 6.5 % polyacrylamide gel (Kbplus gel matrix) using the LI-COR. The 50-700 bp sizing standard from LI-COR is used as size marker.

TP-BUFFERS

10 x RL-buffer :

100 mM Tris-Hac (pH 7.5)
100 mM MgAc₂
500 mM KAc
50 mM DTT

10 ml

1 ml Tris-Hac 1M (pH7.5)
1 ml MgAc₂ 1 M
1.25 ml KAc 4M
0.077 g DTT
Add H₂O to 10 ml

2xSTEX- buffer :

2 M NaCl
20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
2 mM EDTA (0.5 M)
0.2 % TritonX-100

100 ml

40 ml NaCl 5M
2 ml Tris-HCl 1M (pH 8.0)
400 µl EDTA (0.5 M)
2 ml TritonX-100 (10 %)
Add H₂O to 100 ml

10 x PCR-buffer :

100 mM Tris-HCl (pH 8.3)
25 mM MgCl₂
500 mM KCl

10 ml

1 ml Tris-HCl 1 M (pH 8.3)
250 µl MgCl₂ 1 M
2.5 ml KCl (2 M)
Add H₂O to 10 ml

T₁₀E_{0.1} :

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
0.1 mM EDTA (pH 8.0)

100 ml

1 ml Tris-HCl 1 M (pH 8.0)
20 µl EDTA 0.5 M
Add H₂O to 100 ml

Formamide loading dye (³³P) :

2 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)
98 ml Formamide
0.06 g bromophenol blue

10 x T4-buffer :

250 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
5 mM spermidine (3 HCl.form)
0.06 xylenecyanol

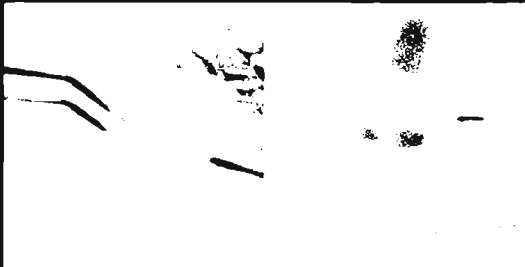
10 ml

2.5 ml 1M Tris-HCl (pH 7.5)
1 ml MgCl₂ 1 M
0.077 g DTT
0.013 g spermidine
Add H₂O to 10 ml

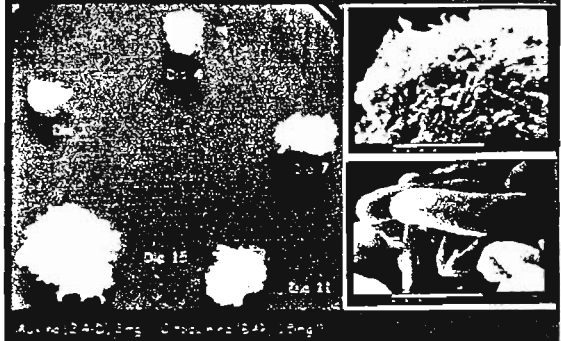
ANEXO 3

Iniciación embriogénesis somática

Inducción: Rescate de tejido embriónico desde el megagametofito



Proliferación tejido embriónico



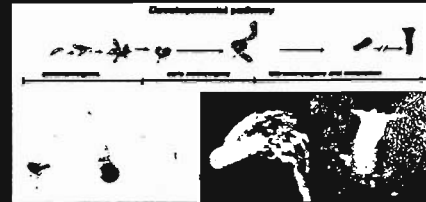
Maduración de embriones en vitro



Ácido ascórbico (AA), 15mg/l. Glutamina 7g/l. Arginina 1g/l

Embriogénesis somática en *P. radiata*

- Actúan como marcadores en la vía de desarrollo de señales
- Expresión diferencial de genes
- Se observan estos eventos en cultivos



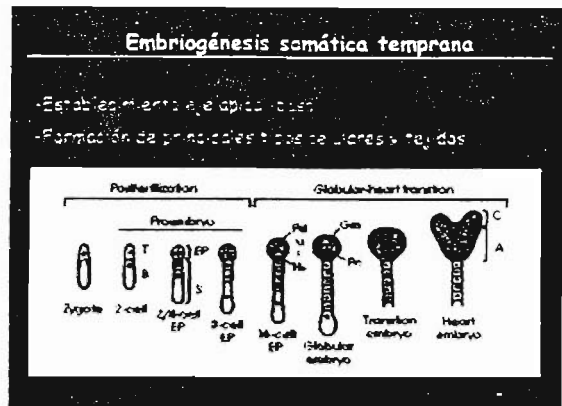
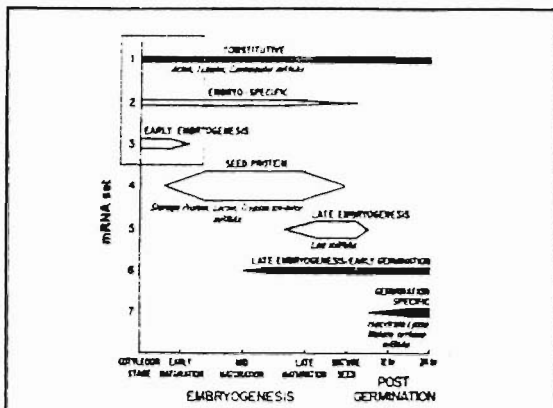
OBJETIVO GENERAL

"IDENTIFICAR GENES QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *P. radiata*"

Embriogénesis somática en *P. radiata*

Conocer eventos moleculares involucrados en la embriogénesis somática

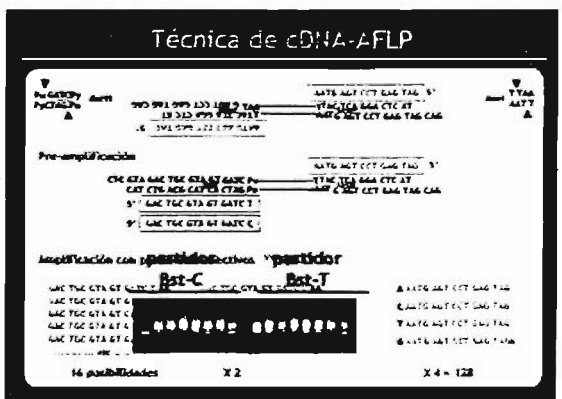
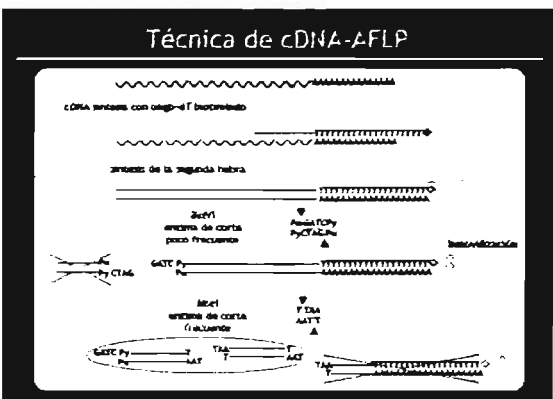
- Inferir la activación o represión de vías metabólicas
- Conocer estímulos externos que controlan la expresión de los genes identificados
- Identificar "marcadores moleculares" específicos de cada estado de desarrollo

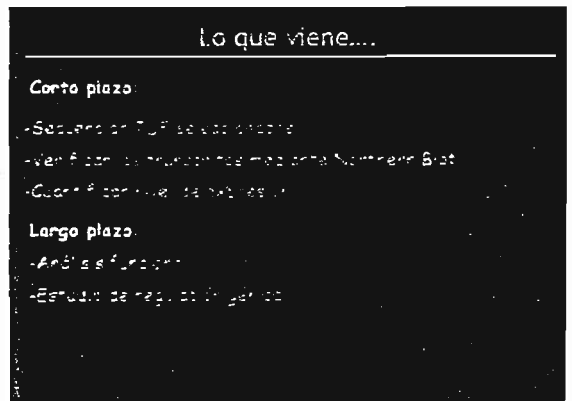
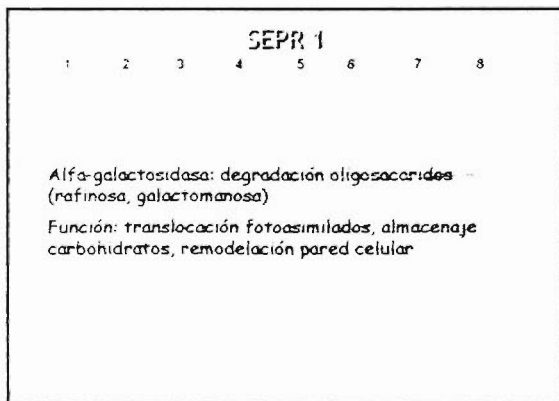
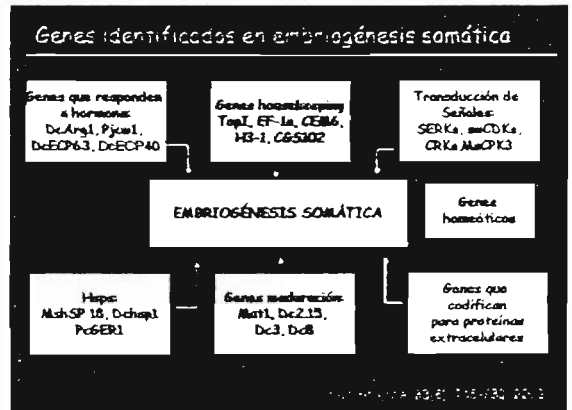
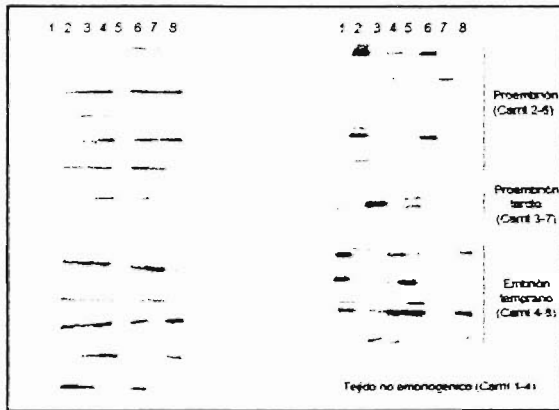
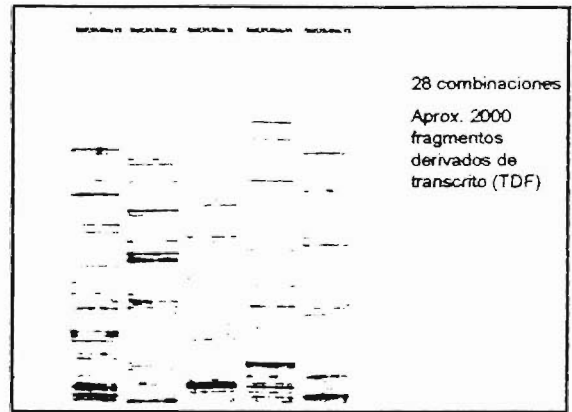


TÉCNICAS UTILIZADAS EN ESTUDIO DE EXPRESIÓN GENICA

Técnica	Aplicación	Organismo	Referencia
Microarrays	Identificación de genes expresados	Arabidopsis	Wang et al. (2001)
RT-PCR	Medición de niveles de expresión	Arabidopsis	Wang et al. (2001)
Microarrays	Identificación de genes expresados	Arabidopsis	Wang et al. (2001)
RT-PCR	Medición de niveles de expresión	Arabidopsis	Wang et al. (2001)
Microarrays	Identificación de genes expresados	Arabidopsis	Wang et al. (2001)
RT-PCR	Medición de niveles de expresión	Arabidopsis	Wang et al. (2001)

Current Opinion in Plant Biology 2001, 4:136-142







ANEXO 4



Universidad Católica del Chile
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ingeniería Bioquímica y Microbiología

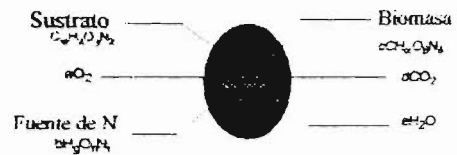


CONICHO DE Chile
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

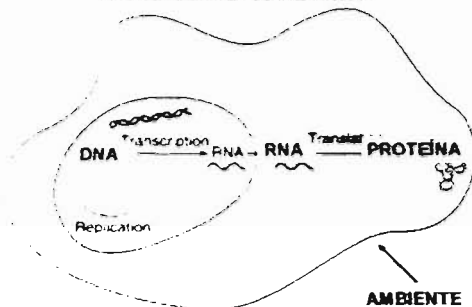
"Incorporación de la técnica de AFLP-TP en la optimización del proceso de embriogénesis somática en *Pinus radiata*"

Felipe Aguero Zaballos

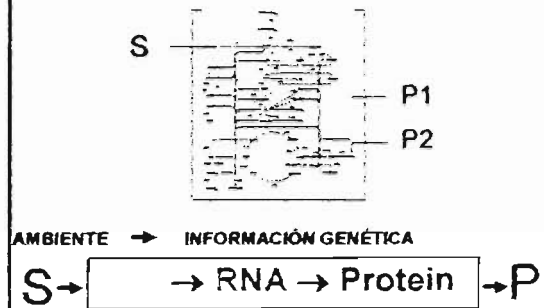
Representación macroscópica del metabolismo celular



El flujo de la información genética en la célula eucarionte

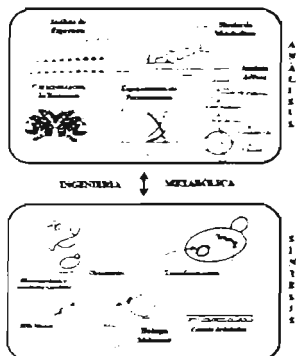


MODELO METABÓLICO

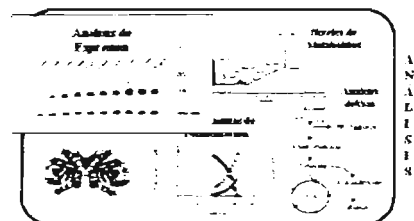


INGENIERÍA METABÓLICA

Uso de modificaciones genéticas y/o fisiológicas dirigidas para incrementar la formación de productos en una célula o sus propiedades celulares.



PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA



PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Transcriptoma



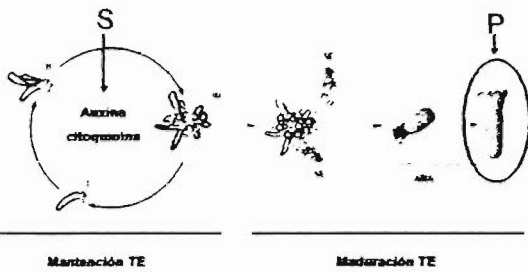
Proteoma



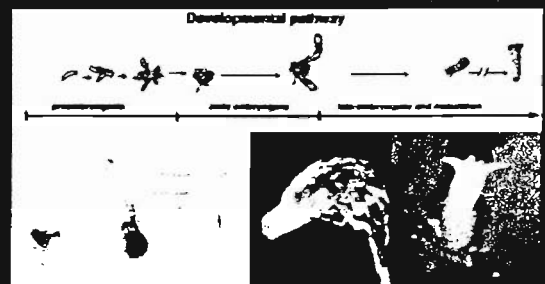
Aplicaciones del análisis de flujos metabólicos

- Cuantificación de la Fisiología celular
- Formulación óptima de medios de cultivo
- Diseño y optimización de bioprocesos
- "Blancos" para ingeniería genética

Embriogénesis somática en *Pinus radiata*

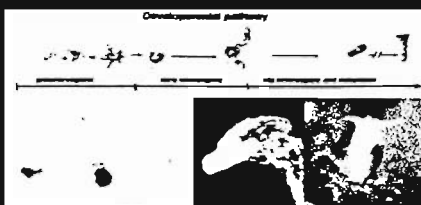


Embriogénesis somática en *Pinus radiata*



Embriogénesis somática en *P. radiata*

- Activación o represión de vías de transducción de señales
- Expresión diferencial de genes
- Se desconocen estos eventos en otros



OBJETIVO GENERAL

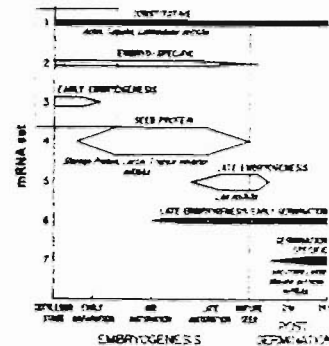
"IDENTIFICAR GENES QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Pinus radiata*"

Embriogénesis somática en *P. radiata*

Conocer eventos moleculares involucrados en la
embriogénesis somática.

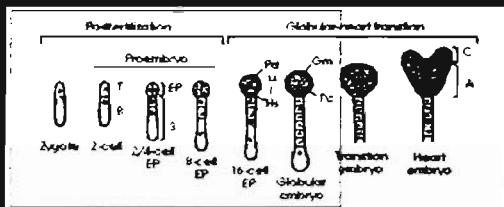
- Inferir la activación e represión de vías metabólicas
- Conocer estímulos externos que controlan la expresión de los genes identificados
- Identificar 'marcadores moleculares' asociados de cada estado de desarrollo

Cambios en la abundancia de mRNA durante la embriogénesis



Embriogénesis somática temprana

- Establecimiento eje apical-basal
- Formación de principales tipos celulares y tejidos

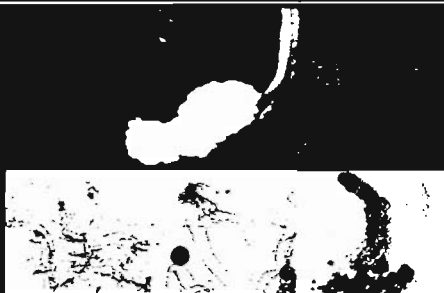


TÉCNICAS UTILIZADAS EN ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA

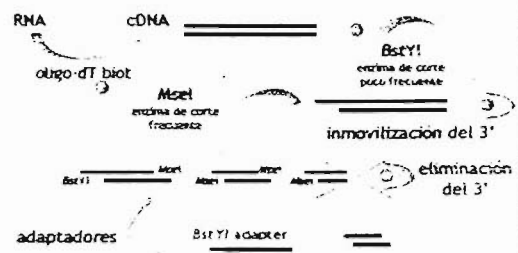
1. <u>Wages</u>	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504	2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513	2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540	2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567	2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576	2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648	2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684	2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693	2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702	2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711	2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720	2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729	2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738	2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747	2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756	2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765	2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774	2775	2776	2777	2778	2779	2780	2781	2782	2783	2784	2785	2786	2787	2788	2789	2790	2791	2792	2793	2794	2795	2796	2797	2798	2799	2800	2801	2802	2803	2804	2805	2806	2807	2808	2809	2810	2811	2812	2813	2814	2815	2816	2817	2818	2819	2820	2821	2822	2823	2824	2825	2826	2827	2828	2829	2830	2831	2832	2833	2834	2835	2836	2837	2838	2839	2840	2841	2842	2843	2844	2845	2846	2847	2848	2849	2850	2851	2852	2853	2854	2855	2856	2857	2858	2859	2860	2861	2862	2863	2864	2865	2866	2867	2868	2869	2870	2871	2872	2873	2874	2875	2876	2877	2878	2879	2880	2881	2882	2883	2884	2885	2886	2887	2888	2889	2890	2891	2892	2893	2894	2895	2896	2897	2898	2899	2900	2901	2902	2903	2904	2905	2906	2907	2908	2909	2910	2911	2912	2913	2914	2915	2916	2917	2918	2919	2920	2921	2922	2923	2924	2925	2926	2927	2928	2929	2930	2931	2932	2933	2934	2935	2936	2937	2938	2939	2940	2941	2942	2943	2944	2945	2946	2947	2948	2949	2950	2951	2952	2953	2954	2955	2956	2957	2958	2959	2960	2961	2962	2963	2964	2965	2966	2967	2968	2969	2970	2971	2972	2973	2974	2975	2976	2977	2978	2979	2980	2981	2982	2983	2984	2985	2986	2987	2988	2989	2990	2991	2992	2993	2994	2995	2996	2997	2998	2999	3000	3001	3002	3003	3004	3005	3006	3007	3008	3009	3010	3011	3012	3013	3014	3015	3016	3017	3018	3019	3020	3021	3022	3023	3024	3025	3026	3027	3028	3029	3030	3031	3032	3033	3034	3035	3036	3037	3038	3039	3040	3041	3042	3043	3044	3045	3046	3047	3048	3049	3050	3051	3052	3053	3054	3055	3056	3057	3058	3059	3060	3061	3062	3063	3064	3065	3066	3067	3068	3069	3070	3071	3072	3073	3074	3075	3076	3077	3078	3079	3080	3081	3082	3083	3084	3085	3086	3087	3088	3089	3090	3091	3092	3093	3094	3095	3096	3097	3098	3099	3100	3101	3102	3103	3104	3105	3106	3107	3108	3109	3110	3111	3112	3113	3114	3115	3116	3117	3118	3119	3120	3121	3122	3123	3124	3125	3126	3127	3128	3129	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	3140	3141	3142	3143	3144	3145	3146	3147	3148	3149	3150	3151	3152	3153	3154	3155	3156	3157	3158	3159	3160	3161	3162	3163	3164	3165	3166	3167	3168	3169	3170	3171	3172	3173	3174	3175	3176	3177	3178	3179	3180	3181	3182	3183	3184	3185	3186	3187	3188	3189	3190	3191	3192	3193	3194	3195	3196	3197	3198	3199	3200	3201	3202	3203	3204	3205	3206	3207	3208	3209	3210	3211	3212	3213	3214	3215	3216	3217	3218	3219	3220	3221	3222	3223	3224	3225	3226	3227	3228	3229	3230	3231	3232	3233	3234	3235	3236	3237	3238	3239	3240	3241	3242	3243	3244	3245	3246	3247	3248	3249	3250	3251	3252	3253	3254	3255	3256	3257	3258	3259	3260	3261	3262	3263	3264	3265	3266	3267	3268	3269	3270	3271	3272	3273	3274	3275	3276	3277	3278	3279	3280	3281	3282	3283	3284	3285	3286	3287	3288	3289	3290	3291	3292	3293	3294	3295	3296	3297	3298	3299	3300	3301	3302	3303	3304	3305	3306	3307	3308	3309	3310	3311	3312	3313	3314	3315	3316	3317	3318	3319	3320	3321	3322	3323	3324	3325	3326	3327	3328	3329	3330	3331	3332	3333	3334	3335	3336	3337	3338	3339	3340	3341	3342	3343
-----------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Current Opinion in Plant Biology 2001, 4:136-142

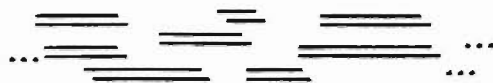
Estados de desarrollo analizados

[illegible]

AFLP-TP
Principio



AFLP-TP Principio



primera amplificación: *Bst*YI-primers $\xrightarrow{+T}$ *Mse*I-primer

segunda amplificación: *Bst*YI-primers $\xrightarrow{+T, IN}$ *Mse*I-primer

2x16x4=128
parejas de partidores

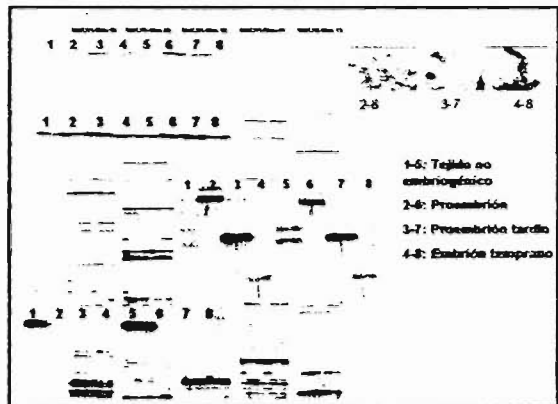
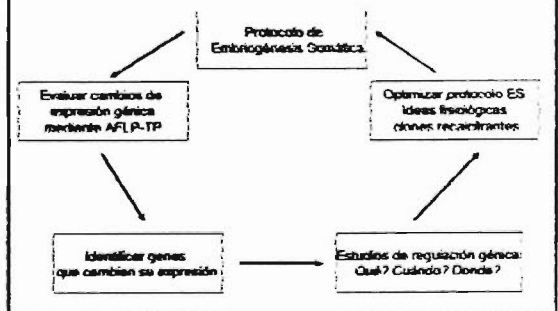


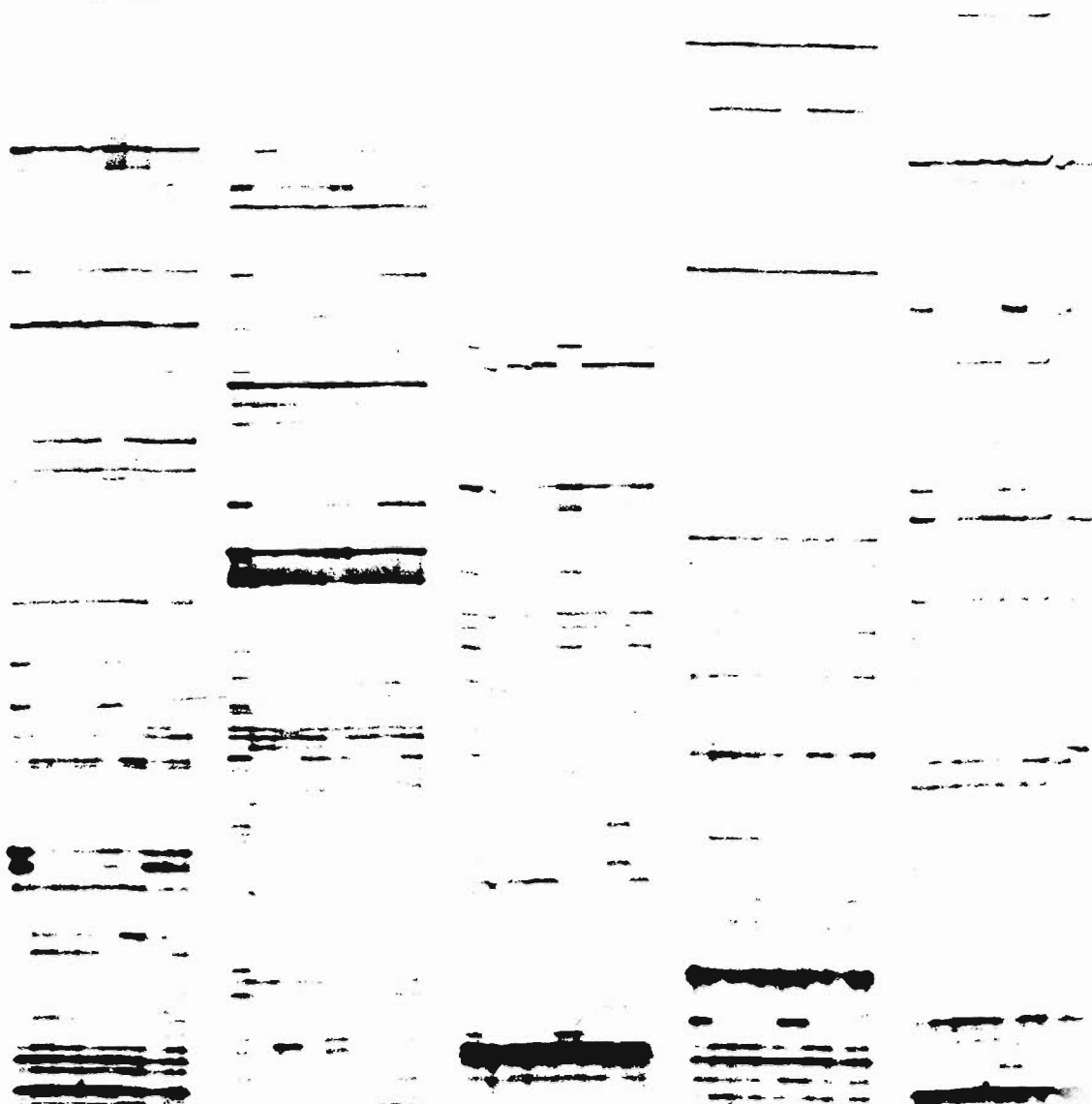
TABLA RESULTADOS PRELIMINARES

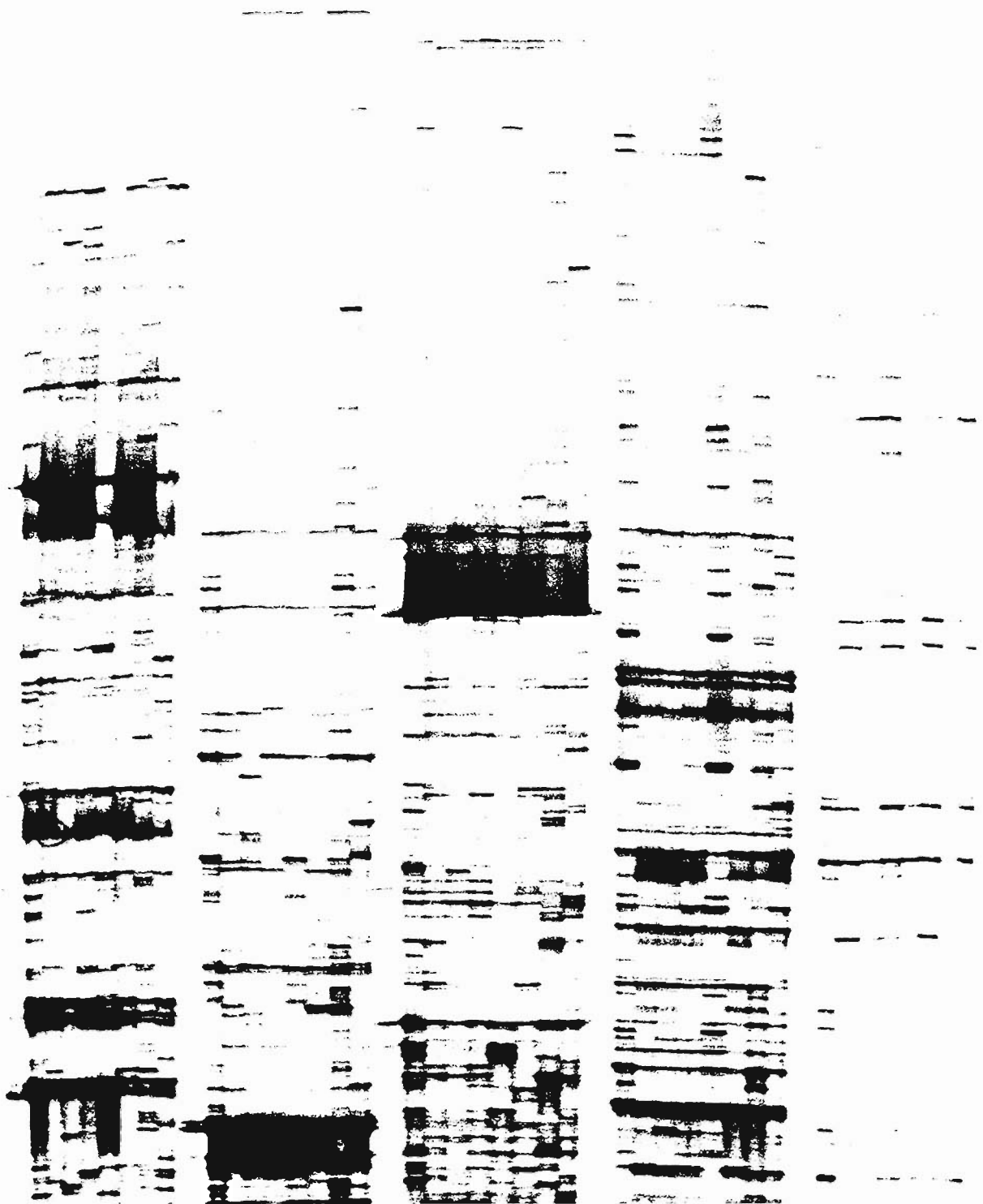
TDF total:	1960	100 %
TDF expresados diferencialmente	70	3.57 %
TDF no embrionicos:	31	1.58 %
TDF embrionicos:	39	1.99 %

Estrategia para la optimización del protocolo de embriogénesis somática



ANEXO 5







THE
RECORDS
OF THE
CITY OF
NEW YORK
FOR THE
YEAR
1898
PUBLISHED
BY THE
CITY OF NEW YORK
1899

ANEXO 6

**Abril 22, 2004
Santo Domingo
República Dominicana**

Estimado **Felipe Aquea Z.**:

Por medio de la presente acusamos recibo de su ponencia titulada **“Identificación de genes que se expresan diferencialmente durante la embriogénesis somática temprana de *Pinus radiata*”** y solicitamos su colaboración para el ajuste de su resumen, al formato establecido para el REDBIO 2004, ya que el mismo será publicado tanto en formato duro como electrónico.

Para mayor facilidad le sugerimos tomar nota en los siguientes puntos:

1. Favor sírvase de ver el formato adjunto, publicado desde noviembre del año 2003 en el sitio Web:
(<http://www.redbio.org/rdominicana/redbio2004rd/redbio2004/resumenes.htm>)
2. Favor remitirnos de nuevo su resumen en los idiomas inglés y español.
3. Le recordamos que el número de ponencias orales en REDBIO 2004 es limitado. Por lo que muchos de los trabajos se presentaran como posters.
4. Cualquier duda sobre la redacción del resumen, favor remitirse a la normas de la ASA (American Society of Agronomy), en su página Web: <http://www.asa-cssa-sssa.org>

Esperando recibir su pronta respuesta y rectificándole nuestro deseo de verlo en REDBIO 2004.

Comité de Resúmenes
REDBIO 2004

“Identificación de genes que se expresan diferencialmente durante la embriogénesis somática temprana de *Pinus radiata*”

Felipe Aquea y Patricio Arce-Johnson.

Laboratorio de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. E-mail: parce@genes.bio.puc.cl

Embriogénesis somática (ES) es la técnica de propagación más utilizada para la multiplicación de especies vegetales. En nuestro laboratorio se ha implementado esta técnica en *Pinus radiata*, especie vegetal de mayor importancia comercial para Chile. Es necesario optimizar este proceso debido a que los rendimientos de producción de embriones no son adecuados para su uso comercial a gran escala. Los avances en la optimización de la ES han sido limitados, debido en parte a que se desconocen los eventos moleculares y los genes que participan durante el crecimiento y desarrollo del embrión. Es por esto que hemos implementado la técnica de cDNA-AFLP en *Pinus radiata* como una herramienta que nos permita identificar genes que se expresen durante la ES. Inicialmente estudiamos la ES temprana debido que durante esta etapa ocurren los cambios críticos para la morfogénesis de la planta, se establece el eje apical-basal y comienzan a formarse los principales tipos celulares y tejidos. Analizamos 3 estadios de desarrollo: Proembrión (15 días en 3mg/l 2,4-D y 1,5 mg/l BAP), proembrión tardío (15 días en 15 mg/l ABA) y embrión temprano o polar (30 días en 15 mg/l ABA), utilizando como control tejido indiferenciado no embriogénico (15 días a 3mg/l 2,4-D y 1,5 mg/l BAP). En un análisis preliminar hemos amplificado más de 2.000 Fragmentos Derivados de Transcritos (FDT), de los cuales hemos seleccionado 30 FDT que se acumulan en estados específicos del desarrollo o que presentan un patrón de expresión diferencial durante los estadios de desarrollo analizados. La identificación de genes activos durante el desarrollo embrionario junto con su perfil transcripcional (inducción o represión) pueden ser utilizados para inferir la activación o represión de vías metabólicas o bioquímicas, y de esta manera desarrollar estrategias que permitan optimizar este proceso.

Agradecimientos: Proyecto FONDEF Genómica de virus en vides G0251001
Programa formación para la innovación agraria, FIA

“Identification of genes differentially expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata*”

Felipe Aquea y Patricio Arce-Johnson.

Laboratorio de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas.
Pontificia Universidad Católica de Chile. E-mail: parce@genes.bio.puc.cl

Somatic embryogenesis (SE) is an efficient technique for propagation of plants. We have implemented this method of propagation in *Pinus radiata*. Is necessary to improve this technique because the number of mature embryos produced in culture is not enough for large scale propagation. Methods for improving SE have being limited, due to little knowledge of molecular events and genes that participate during the growth and development of somatic embryos. For this reason we have implemented cDNA-AFLP in *Pinus radiata* for to identify genes expressed during SE. Initially we have studied the early SE, because these stages are crucial for successful completion of the overall process. We have analyzed 3 stages of somatic embryo development: Proembryo (15 days in 3mg/l 2,4-D and 1,5 mg/l BAP), late proembryo (15 days in 15 mg/l ABA) and early embryo (30 days in 15 mg/l ABA). Like a control we have used no-embryogenic tissue (15 days in 3mg/l 2,4-D and 1,5 mg/l BAP). In a preliminary study we have amplified almost 2000 transcript-derived fragments (TDF), of which we have choose 30 TDF that expressed in specific stage or with differential patron during the stages analyzed. The identification de genes activated during the SE can be used like a tool for improving this process.

Acknowledgements: Proyecto FONDEF Genómica de virus en vides G0251001
Programa formación para la innovación agraria, FLA